

# MALE TISSUE-PREFERRED REGULATORY REGION AND METHOD OF USING SAME

**Publication number:** WO9859061

**Publication date:** 1998-12-30

**Inventor:** ALBERTSEN MARC C; FOX TIMOTHY W; GARNAAT CARL W; HUFFMAN GARY A; KENDALL TIMMY L

**Applicant:** PIONEER HI BRED INT (US)

**Classification:**

**- international:** A01H5/00; C07K14/34; C12N5/10; C12N9/10; C12N9/22; C12N9/24; C12N15/09; C12N15/29; C12N15/82; A01H5/00; C07K14/195; C12N5/10; C12N9/10; C12N9/22; C12N9/24; C12N15/09; C12N15/29; C12N15/82; (IPC1-7): C12N15/82; A01H5/00; C07K14/34; C12N9/00; C12N9/10; C12N9/22; C12N9/24; C12N15/29; C12Q1/68

**- European:** C07K14/34; C12N9/10C1A74; C12N9/22; C12N9/24; C12N15/82B20B2; C12N15/82C8D2

**Application number:** WO1998US12895 19980619

**Priority number(s):** US19970880499 19970623

**Also published as:**

WO9859061 (A1)  
EP0994956 (A1)  
EP0994956 (A1)  
US6037523 (A1)  
ZA9805408 (A)

more >>

**Cited documents:**

WO9613588  
WO9616182  
WO9529247  
WO9617945  
WO9640925

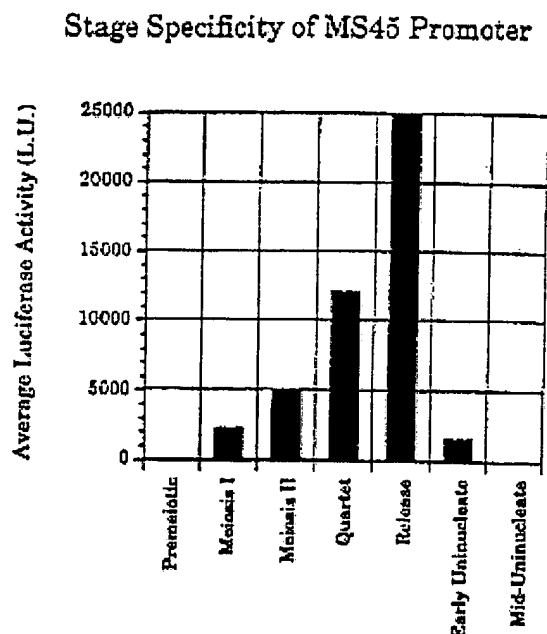
more >>

[Report a data error here](#)

## Abstract of WO9859061

The present invention relates to an isolated nucleic sequence encoding the Ms45 male tissue-preferred regulatory region. In one aspect this invention relates to the use of this male tissue-preferred regulatory region in mediating fertility. An example of such use is the production of hybrid seed such as in a male sterility system. The Ms45 male tissue-preferred regulatory region can be operably linked with exogenous genes, such as those encoding cytotoxins, complementary nucleotidic units and inhibitory molecules. This invention also relates to plant cells, plant tissue and differentiated plants which contain the regulatory region in this invention.


Stage Specificity of the Ms45 Male Tissue-Preferred Regulatory Region



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

# Documentos completos

 **Nueva  
búsqueda**

 **Reformular  
la pregunta**

 **Lista de las  
respuestas**

 **Página  
Inicio B.D.**

## Documento 1

**Clasif.Principal** A01H005/00

**Título** SECUENCIA NUCLEOTIDICAS QUE CODIFICA PARA UNA REGION REGULADORA (MS45) CON PREFERENCIA CON TEJIDOS MASCULINOS, UTILES PARA EXPRESAR PROTEINAS EXOGENAS EN TEJIDOS MASCULINOS E INVERTIR EN LA FERTILIDAD.

**NºPublic.** 199801448

**NºSolicitud** CLP199801448

**F.Solicitud** 19980623

**F.Pub.Con.** 19990319

**Solicitante** PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.

**Inventores** MARC C. ALBERTSEN, TIMOTHY W. FOX, CARL W. GARNAAT, GARY A. HUFFMAN Y TIMMY L. KENDAL

**Prioridades** US1997062308880499


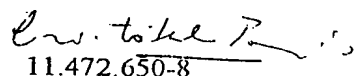

**Resumen** La presente invención se relaciona con una secuencia aislada de ácidos nucleicos que codifica la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos Ms45. En un aspecto esta invención se relaciona con el uso de esta región reguladora con preferencia por tejidos masculinos para intervenir en la fertilidad. Un ejemplo de dicho uso es la producción de semillas híbridas, tal como en un sistema de esterilidad masculino. La región reguladora con preferencia por tejidos masculinos Ms45 se puede usar operativamente con genes exógenos, como aquellos que codifican citotoxinas, unidades nucleotídicas complementarias y moléculas inhibitoras. Esta invención también se relaciona con células vegetales, tejidos vegetales y plantas diferenciadas que contienen la región reguladora de esta invención.

**Cod. Publ.** A

Petición de búsqueda : ((CLP199801448) :NSOL )

[Ayuda](#)

INSTRUCCIONES:  
1.- LLENAR SOLAMENTE LOS RECUADROS DE TONO ROSADO CON CARACTERES NEGROS DE MAQUINANO (MUSCRITO)  
2.- SE ENTIENDE POR PRIORIDAD AQUELLA PROTECCION SOLICITADA O CONCEDIDA ANTERIORMENTE POR EL MISMO INVENTO, GENERALMANTE EN EL EXTRANJERO

<b>20</b> FECHA DE SOLICITUD  DIA      MES      AÑO		 <b>REPÚBLICA DE CHILE</b> MINISTERIO DE ECONOMIA FOMENTO Y RECONSTRUCCION SUBSECRETARIA DE ECONOMIA DEPTO. PROPIEDAD INDUSTRIAL	<b>11</b> NUMERO DE PRIVILEGIO
<b>41</b>  DIA      MES      AÑO			<b>21</b> NUMERO DE SOLICITUD <b><u>98-1448</u></b>
<b>12</b> TIPO DE SOLICITUD  <input checked="" type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCIÓN <input type="checkbox"/> PATENTE DE PRECAUCIONAL <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD <input type="checkbox"/> DISEÑO INDUSTRIAL <input type="checkbox"/> TRANSFERENCIA <input type="checkbox"/> CAMBIO DE NOMBRE <input type="checkbox"/> LICENCIA		<b>PRIORIDAD:</b> TIPO <input checked="" type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCIÓN <input type="checkbox"/> PATENTE PRECAUCIONAL <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD <input type="checkbox"/> DISEÑO INDUSTRIAL  <b>ESTADO</b> <input type="checkbox"/> CONCEDIDA <input checked="" type="checkbox"/> EN TRAMITE  08/ 880.499 <b>31</b> N°: <b>33</b> PAIS: USA <b>32</b> FECHA: 23 jun, 97	<b>DOCUMENTOS ACOMPAÑADOS</b>  <input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input checked="" type="checkbox"/> MEMORIA DESCRIPTIVA <input checked="" type="checkbox"/> PLIEGO DE REIVINDICACIONES <input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS <input checked="" type="checkbox"/> PODER <input checked="" type="checkbox"/> CESION(5) <input checked="" type="checkbox"/> COPIA PRIORIDAD <input type="checkbox"/> PROTOTIPO  <input checked="" type="checkbox"/> CERTIFICADA <input type="checkbox"/> TRADUCIDA AL ESPAÑOL
<b>TITULO O MATERIA DE LA SOLICITUD</b>  Región reguladora con preferencia por tejidos masculinos y método para el uso de la misma.			
<b>7</b> SOLICITANTE(S): (APELLIDO PATERNO, APELLIDO MATERNO, NOMBRES - CALLE, COMUNA, CIUDAD, PAIS, TELEFONO)  <b>Pioneer Hi-Bred International, Inc.</b>  800 Capital Square, 400 Locust Street, Des Moines, Iowa 50309, USA			
<b>72</b> INVENTOR O CREADOR: (APELLIDO PATERNO, APELLIDO MATERNO, NOMBRES - NACIONALIDAD)  <b>Marc C. Albertsen</b> -estadounidense.- <b>Timothy W. Fox</b> -estadounidense.- <b>Carl W. Garnaat</b> -estadounidense.- <b>Gary A. Huffman</b> -estadounidense.- <b>Timmy L. Kendall</b> -estadounidense.-			
<b>74</b> REPRESENTANTE:(APELLIDO PATERNO, APELLIDO MATERNO, NOMBRES - CALLE, COMUNA, CIUDAD, TELEFONO)  <b>Marino Porzio y/o Hernán Ríos de M.</b> <b>y/o Cristóbal Porzio y/o Rafael Covarrubias</b>  <b>Santa Lucía No.330, Piso 7° ,</b> <b>SANTIAGO DE CHILE</b>  ( F. 639 77 11 )			
<b>DECLARO/ DECLARAMOS QUE LOS DATOS QUE APARECEN EN LOS RECUADROS DE TONO ROSADO SON VERDADEROS Y TAMBIEN CONOCER EL ART. 44 DE LA LEY N° 19.039 SOBRE PROPIEDAD INDUSTRIAL Y QUE EL PRESENTE DOCUMENTO CONSTITUYE UNA SOLICITUD FORMAL.</b>   <b>11.472.650-8</b> <b>FIRMA Y R.U.T. REPRESENTANTE</b>			<b>RECEPCION</b>  <b>FIRMA Y R.U.T. SOLICITANTE</b>

# HOJA TECNICA



REPUBLICA DE CHILE  
MINISTERIO DE ECONOMIA  
FOMENTO Y RECONSTRUCCION  
SUBSECRETARIA DE ECONOMIA  
DEPTO. PROPIEDAD INDUSTRIAL

(19) PAIS: CHILE

(21) N° DE SOLICITUD:

(12) TIPO DE SOLICITUD:

☒ INVENCIÓN (A)

☐ PRECAUCIÓN (PR)

☐ PRIMARIA (1)

☐ MODELO DE UTILIDAD (U)

☐ ADICIONAL (2)  
(PERFECCIONAMIENTO)  
A LA PATENTE N°:

☐ REVALIDA (R)

(11) N° DE PATENTE:

(72) INVENTOR: Marc C. Albertsen  
Timothy W. Fox  
Carl W. Garnaat  
Gary A. Huffman  
Timmy L. Kendal

AGENTE:

Porzio, Ríos & Asociados

(19) CL (12)	(41) DISP.	D	M	A	(51) CIP 5
(21)	(22) SOL				
(11)	(24) VIG				
(30) <input checked="" type="checkbox"/> PRIORIDAD	<input type="checkbox"/> REVALIDA	D	M	A	
PAIS y N° USA	08/ 880.499	23	jun, 97		

(71) SOLICITANTE: Pioneer Hi-Bred International, Inc.

PAIS: USA

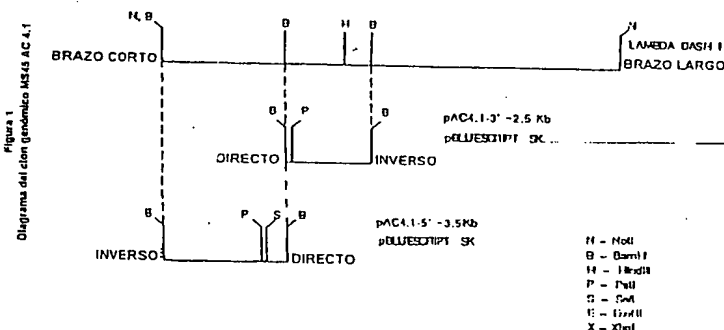
DIRECCION: 800 Capital Square, 400 Locust Street, Des Moines, Iowa 50309, USA

(54) TITULO: Región reguladora con preferencia por tejidos masculinos y método para el uso de la misma.

(57) RESUMEN, PALABRA CLAVE Y DIBUJO O FORMULA:

La presente invención se relaciona con una secuencia aislada de ácidos nucleicos que codifica la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos Ms45. En un aspecto esta invención se relaciona con el uso de esta región reguladora con preferencia por tejidos masculinos para intervenir en la fertilidad. Un ejemplo de dichos uso es la producción de semillas híbridas, tal como en un sistema de esterilidad masculino. La región reguladora con preferencia por tejidos masculinos Ms45 se puede ligar operativamente con genes exógenos, como aquellos que codifican citotoxinas, unidades nucleotídicas complementarias y moléculas inhibitoras. Esta invención también se relaciona con células vegetales, tejidos vegetales y plantas diferenciadas que contienen la región reguladora de esta invención.

CLON GENÓMICO AC4.1 - 13 KB



## MEMORIA DESCRIPTIVA

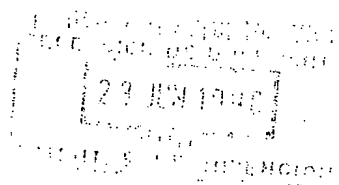
### **REGIÓN REGULADORA CON PREFERENCIA POR TEJIDOS MASCULINOS Y MÉTODO PARA EL USO DE LA MISMA**

#### **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se relaciona con secuencias aisladas de ADN que actúan como regiones reguladoras en células eucariotas. Más específicamente, la presente invención se relaciona con secuencias aisladas de ADN de maíz que actúan como regiones reguladoras con preferencia por tejidos masculinos y cumplen una función en la expresión de genes en los tejidos masculinos. La presente invención también está dirigida a un método para conferirle a un gen, que habitualmente puede o no expresarse en tejidos masculinos, la capacidad de expresarse de manera preferencial en tejidos masculinos.

#### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La expresión y regulación de genes específicos de tejidos o de momentos del ciclo de vida se observan, *inter alia*, durante la reproducción sexual en eucariontes. En la gametogénesis vegetal, se producen importantes cambios citológicos y bioquímicos durante el desarrollo del polen cuando la división mitótica asimétrica de las microsporas haploides da como resultado la formación de dos células; cada una de ellas con diferentes destinos en términos del desarrollo. La célula vegetativa sustenta el crecimiento del polen, en tanto la célula generativa sufre mitosis y se desarrolla en una célula espermática. Se han identificado ARN mensajeros específicos para ambas vías en el polen de plantas tales como maíz, tomate, tabaco, arroz y trinitaria; y también se han identificado mensajes específicos del polen u otros tipos celulares pertenecientes a la antera tales como el tapete, la epidermis y el estomio.

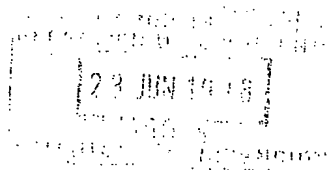


La expresión de los genes del polen durante la diferenciación involucra una cantidad estimada en 24.000 genes (Willing, et al., "An Analysis of the Quantity and Diversity of mRNA's From Pollen and Shoots of *Zea mays*"; Theor. Appl. Genet.; Vol. 75; págs. 751-753; (1988)); sin embargo solamente un 10% de los clones de una biblioteca de ADNc son específicos del sexo masculino (Stinson, et al., "Genes Expressed in the Male Gametophyte and Their Isolation"; Plant Physiol. Vol 83; págs. 442-447; (1987) y el porcentaje de genes expresados en el polen que son específicos del mismo se encuentra entre un 5% y un 80% (Willing, et al., "An Analysis of the Quantity and Diversity of mRNA's From Pollen and Shoots of *Zea mays*"; Theor. Appl. Genet.; Vol. 75; págs. 751-753; (1988)). Este proceso complejo de microsporogénesis involucra la producción consecutiva de muchos productos génicos.

Se han clonado genes específicos de plantas masculinas; se ha demostrado que dos de ellos, el gen Ms45 de maíz (Patente de EE.UU. N°: 5.478.369) y el gen Ms2 de *Arabidopsis* (Mark, G.M., et al., Nature; Vol. 363; págs. 715-717; (1993)), son necesarios para el desarrollo del polen. Otros ejemplos de promotores específicos del sexo masculino en plantas incluyen ZM13, PG y SGB6.

El promotor Zm13 se describe en la Patente de EE.UU. N°: 5.086.169. Consta de 1315 pares de bases y proviene de un gen específico de polen descrito por Hanson, et al., Plant Cell; Vol. 1; págs. 173-179; (1989). Este gen se hibridiza con ARNm que solamente se encuentra en polen.

Se ha aislado y caracterizado otro promotor específico de polen hacia el extremo 5' del gen de la poligalacturonasa específico de polen (PG) Patente de EE.UU. N°: 5.412.085. Esta región promotora abarca 2687 pares de bases y se



expresa predominantemente en polen y espiguillas emergentes, pero no en las espiguillas pre-emergentes. En la Patente de EE.UU. N°: 5.545.546, también de Allen, se describe otro promotor del gen de la poligalacturonasa de maíz. Solamente se expresa en polen y en espiguillas emergentes.

En la Patente de EE.UU. N°: 5.470.359 se describe una región reguladora del gen SGB6 de maíz que confiere especificidad de tejido. Este tejido de expresión, el tapele, es una capa de células que rodea a las células microsporógenas en la antera y proporciona nutrientes a las mismas.

En la Patente de EE.UU. N°: 5.477.002 se describen nueve clones genómicos y de ADNc específicos de anteras de tabaco. Los clones de ADNc eran específicos de la antera, comprobado por análisis Northern, si bien diferían en los perfiles de desarrollo. El clon Ant32 es específico de la antera.

En la Patente de Europa N°: 0 420 819 se describe un método para producir plantas masculinas estériles con el gen *wun1*.

En la publicación PCT WO 90/08825 se describen los ADNc específicos de anteras TA12, TA26 y TA29 y su uso en un sistema de esterilidad masculina.

En la publicación PCT WO 90/08825 se describen los genes de esterilidad masculina *pMS10*, *pMS14* y *pMS18* y su uso con el gen informante *GUS*.

En la Patente de EE.UU. N°: 5.589.610 se explica un promotor correspondiente a un ADNc específico de anteras y el AC444 ADNc de expresión preferente en anteras.

El uso de un promotor vegetal y un gen exógeno para efectuar un cambio en la composición genética de plantas es conocido en el arte (Patente

de EE.UU. Nº: 5.432.068, 5.412.085, 5.545.546, 5.470.359 y 5.478.389). En estas patentes se describen casetes de expresión vegetales con un promotor específico de tejidos ligado a un gen para lograr esterilidad, fertilidad masculinos u otro tipo de expresión del gen en un tejido específico. Sin embargo, estas patentes no explican el uso de esta región reguladora con preferencia por tejidos masculinos ni el uso de esta región reguladora con preferencia por tejidos masculinos con un gen exógeno como un método para controlar la esterilidad masculina.

La presente invención está dirigida a una región reguladora específica de tejidos masculinos y con los métodos para utilizar la misma. La expresión de un gen con preferencia por tejidos masculinos puede intervenir en la fertilidad masculina y es de utilidad en muchos sistemas, como la producción de semillas híbridas.

#### **RESUMEN DE LA INVENCION**

Uno de los objetivos de la presente invención es proveer un método para expresar genes exógenos con preferencia por tejidos masculinos utilizando un vector de expresión que confiere expresión preferencial en tejidos masculinos a un gen exógeno. Este proceso se puede utilizar para restaurar (como en un sistema de esterilidad masculina) o impactar de otra manera en la fertilidad, como por ejemplo en la producción de semillas híbridas. Otro objetivo de la invención es ofrecer una región reguladora de ADN que confiera una expresión génica con preferencia por tejidos masculinos. También es un objetivo de la invención ofrecer una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos o aquellas que presentan una identidad con la misma del 70%, 75% u 80%, con mayor preferencia del 85% o 90% y con mayor preferencia aún del 95% o 99%.



Uno de los objetivos de esta invención es ofrecer una secuencia aislada de ácidos nucleicos que codifica las regiones reguladoras con preferencia por tejidos masculinos Ms45.

Uno de los objetivos de esta invención es proveer una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos Ms45 de *Zea mays* que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que se muestra en la SEQ ID N°: 1 o aquellas que presentan identidad de secuencia con la misma. También es un objetivo de la invención proveer una secuencia aislada de ácidos nucleicos que codifica una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos Ms45 de *Zea mays* que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que se muestra en la SEQ ID N°: 2 o aquellas que presentan identidad de secuencia con la misma.

Uno de los objetivos de esta invención es ofrecer un vector de expresión recombinante que comprende la secuencia aislada de ácidos nucleicos que se muestra en la SEQ ID N°: 1 o aquellas con identidad de secuencia con la misma, ligado operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica un gen exógeno de manera tal que dicha secuencia de nucleótidos se expresa de modo preferencial en tejidos masculinos de forma tal que promueva la expresión del gen exógeno.

Uno de los objetivos de esta invención es proveer un gen exógeno, donde dicho gen exógeno es Ms45.

Uno de los objetivos de esta invención es ofrecer un método para producir una planta transformada que exprese una secuencia exógena de nucleótidos con preferencia por tejidos masculinos que comprende los pasos de introducir en una planta dicha secuencia exógena de nucleótidos ligada

operativamente a una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos que comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID N°: 2 o aquellas que presentan identidad con la misma. El método en el cual dicho paso de introducción se puede llevar a cabo mediante bombardeo con microproyectiles, puede utilizar *Agrobacterium* o un vector de transferencia que comprenda el plásmido Ti. Además, puede haber más de una copia de dicha secuencia exógena de nucleótidos ligada operativamente a la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos.

Uno de los objetivos de esta invención es ofrecer un método en el cual dicha región reguladora se exprese, con preferencia por tejidos masculinos, en tejidos seleccionados del grupo formado por polen, tapete, antera, espiguilla, células madre de polen y microsporas.

Uno de los objetivos de esta invención es ofrecer una planta transformada que exprese una secuencia exógena de nucleótidos con preferencia por tejidos masculinos que posee una secuencia exógena de nucleótidos ligada operativamente a la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos que se muestra en la SEQ ID N°: 1 o aquellas con identidad de secuencia por la misma. Dicha planta es una monocotiledónea o dicotiledónea. Se puede utilizar cualquier planta capaz de ser transformada, incluyendo, por ejemplo, maíz, girasol, soja, trigo, canola, arroz y sorgo. Esta invención también provee el tejido transformado de la planta transformada. A modo de ejemplo, el tejido puede ser polen, mazorcas, óvulos, anteras, espiguillas, estambres, pistilos y células vegetales. La planta transformada puede contener más de una copia de dicha secuencia exógena de nucleótidos ligada operativamente a una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos.

Uno de los objetivos de esta invención es ofrecer un método para intervenir en la fertilidad de una planta, en el cual la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos exprese dicha secuencia exógena de nucleótidos de manera tal que impacta sobre la fertilidad. Esta secuencia exógena de nucleótidos puede ser cualquier secuencia que intervenga en la fertilidad masculina y puede ser, a modo de ejemplo, una unidad nucleotídica complementaria que codifique dichas moléculas antisentido como ARN antisentido callasa, ARN antisentido bamasa y ARN antisentido chalcona sintetasa, ARN antisentido Ms45 o ribozimas y secuencias guía externas o aptámeros o nucleótidos de una sola cadena. La secuencia exógena de nucleótidos también puede codificar auxinas, rolB, citotoxinas, toxina de la differia, DAM metilasa, avidina o se puede seleccionar de un sistema regulador procarionte. Además, esta secuencia exógena de nucleótidos es un gen de esterilidad masculina o el gen estructural Ms45 y esta planta es una monocotiledónea o dicotiledónea.

Uno de los objetivos de esta invención es ofrecer un método para producir semillas híbridas que comprende la siembra, en yuxtaposición de polinización cruzada, de una planta con fertilidad masculina y una planta con esterilidad masculina producida de acuerdo con el método anterior, permitiendo que se produzca dicha polinización cruzada y la cosecha de las semillas resultantes. Las plantas pueden ser maíz.

Estos y otros objetivos se logran de acuerdo con una realización de la presente invención por medio de la provisión de una molécula aislada de ADN, donde dicha molécula de ADN contiene la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID N°: 1.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, se provee un vector de expresión que comprende un gen exógeno, donde la expresión de dicho gen exógeno se encuentra bajo el control de una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos y donde el producto de dicho gen exógeno impacta sobre la fertilidad masculina.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, se provee un método para utilizar dicho vector de expresión con el fin de producir una planta con esterilidad masculina, que comprende el paso de introducir un vector de expresión en células vegetales, donde el gen exógeno de dicho vector de expresión puede ser una unidad nucleotídica complementaria, tales como moléculas antisentido (ARN antisentido callasa, ARN antisentido ~~banasa~~ y ARN antisentido chalcona sintetasa, ARN antisentido Ms45) o ribozimas y secuencias guía externas, un aptámero o nucleótidos de una sola cadena. La secuencia exógena de nucleótidos también puede codificar auxinas, rolB, citotoxinas, toxina de la difteria, DAM metilasa, avidina o se puede seleccionar de un sistema regulador procarionte.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, se provee un método para utilizar la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos para producir una planta híbrida con fertilidad masculina que comprende los pasos de:

- a) producir una primera planta progenitora con esterilidad masculina que contiene un vector de expresión que comprende una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos y un primer gen exógeno, donde dicha región reguladora con preferencia por tejidos masculinos controla la expresión del primer gen exógeno y donde el producto de dicho primer gen exógeno impide la fertilidad masculina;

b) producir una segunda planta progenitora que contiene un vector de expresión que comprende un segundo gen exógeno, donde la región reguladora controla la expresión del segundo gen exógeno de manera tal que se exprese en tejidos masculinos;

c) fertilizar de forma cruzada el primer progenitor con el segundo progenitor con el fin de producir una planta híbrida, donde los tejidos masculinos de la planta híbrida expresen el segundo gen exógeno y donde el producto de dicho segundo gen exógeno impida la interrupción de la función de la espiguilla provocada por el producto del primer gen exógeno, con lo cual se obtiene una planta híbrida con fertilidad masculina.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, se provee un método para utilizar la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos con el fin de producir una planta híbrida con fertilidad masculina que comprende los pasos de:

a) producir una primera planta progenitora con esterilidad masculina, donde se anula la acción de un primer gen involucrado en la expresión de la fertilidad masculina;

b) producir una segunda planta progenitora que comprende un vector de expresión que contiene una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos y un gen exógeno, donde dicha región reguladora con preferencia por tejidos masculinos controla la expresión del gen exógeno de manera tal que se pueda expresar en tejidos masculinos y pueda complementar funcionalmente la función del gen cuya acción se interrumpió en a);

c) fertilizar de forma cruzada el primer progenitor con el segundo

progenitor con el fin de producir una planta híbrida, donde los tejidos masculinos de la planta híbrida expresa el gen exógeno y donde el producto del gen exógeno impide la interrupción de la función de la espiguilla, con lo cual se produce una planta híbrida con masculinidad fértil.

#### **DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS**

La Figura 1 es un diagrama del clon genómico Ms45 Ac 4.1 y sitios restricción.

La Figura 2 es un mapa plásmido del PHP6045.

La Figura 3 es un autoradiografía de los productos de extensión por cebadores indicando el comienzo de la transcripción del Ms45. Las líneas marcadas con G, A, T, C, corresponden a las reacciones de secuenciación con los dideoxinucleótidos ddGTP, ddATP, ddTTP y ddCTP, respectivamente. Las líneas 1-4 corresponden a reacciones de extensión por cebadores con ARNm de (1) espiguillas, (2) hojas, (3) anteras y (4) hojas.

La Figura 4 es un gráfico de barras que ilustra la especificidad de etapas de la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos Ms45.

La Figura 5 ilustra la especificidad de tejido ilustrada por la falta de actividad en tejido no masculino.

La Figura 6 muestra un análisis Northern del gel de ARNm de antera hibridizado con el gen de fertilidad masculina Ms45.

La Figura 7 muestra los resultados de un análisis mutacional de TATA box.

#### **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

Todas las referencias citadas se incorporan en la presente documentación a modo de referencia.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente documentación poseen el significado que habitualmente tienen para los especialistas en el arte, a quienes está dirigida esta invención. A menos que se mencione lo contrario, las técnicas empleadas o contempladas en la presente documentación son metodologías estándar bien conocidas por los especialistas en el arte. Los materiales, métodos y ejemplos solamente son ilustrativos y no limitantes.

En la descripción que sigue, se utiliza de forma extensiva una cantidad de términos. Se proveen las siguientes definiciones con el fin de facilitar la comprensión de la invención.

#### 1. Definiciones

Similitud o identidad de secuencia, tal como se emplea en el arte, comprende las relaciones entre dos secuencias de polipéptidos o dos secuencias de polinucleótidos, determinadas por comparación de las secuencias. En el arte, el término identidad también significa el grado de relación de secuencia entre dos secuencias polipeptídicas o polinucleótídicas, determinado por la coincidencia entre dos cadenas de dichas secuencias. Tanto la identidad como la similitud se pueden calcular fácilmente (Computational Molecular Biology; Lesk, A.M. ed.; Oxford University Press, Nueva York; (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects; Smith, D.W. ed.; Academic Press, Nueva York; (1993); Computer Analysis of Sequence Data (Parte I); Griffin, A.M. y H.G. Griffin eds.; Humana Press, Nueva Jersey; (1994); von Heinje, G., Sequence Analysis in Molecular Biology; Academic Press; (1987); y Sequence Analysis Primer; Gribskov, M. y J. Devereux eds.; M Stockton Press, Nueva York; (1991)). Si bien existe una

cantidad de métodos para medir la identidad y la similitud entre dos secuencias de polinucleótidos o dos polipéptidos, ambos términos son bien conocidos por los especialistas (von Heinje, G., Sequence Analysis in Molecular Biology; Academic Press; (1987); y Sequence Analysis Primer; Gribskov, M. y J. Devereux eds.; M Stockton Press, Nueva York; (1991); y Carilo, H. y D. Lipman, SIAM, J. Applied Math.; Vol. 48; pág. 1073; (1988)). Los métodos empleados comúnmente para determinar la identidad o similitud entre dos secuencias incluye, sin limitaciones, los que se describen en Carilo, H. y D. Lipman, SIAM, J. Applied Math.; Vol. 48; pág. 1073; (1988). Los métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan de manera tal de otorgar la mayor coincidencia entre las dos secuencias evaluadas. Los métodos para determinar la identidad y similitud son codificados en programas para computadoras. Los métodos programados por computadora preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, sin limitaciones, el paquete de programas GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acid Research; Vol. 12(1); pág. 387; (1984)), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S.F., et al., J. Molec. Biol.; Vol. 215; pág. 403; (1990)).

**Tejido masculino**: consta de tejidos compuestos por un conjunto de células que están involucradas directamente o que sirven de soporte en la reproducción de las gametas masculinas tales como polen, tapete, antera, espiguilla, células madre de polen y microsporas. El **tapete** es el tejido en la antera que está más en contacto con las células madre del polen y las microsporas y probablemente está involucrado en la nutrición de los granos de polen en desarrollo. Las **células madre del polen** sufren dos divisiones meióticas que producen una tetrada de **microsporas** haploides. Las



microsporas a su vez maduran en granos de polen. El polen o los granos de polen son gametofitos masculinos maduros que pueden presentar la capacidad de fertilizar plantas que son compatibles entre sí. La antera es aquella porción del estambre en la cual se produce el polen y el resto del estambre está formado por el filamento, del cual depende la antera. El estambre es el órgano masculino de la flor.

La región reguladora con preferencia por tejidos masculinos es una secuencia de nucleótidos que dirige un nivel mayor de transcripción de un gen asociado en los tejidos masculinos que en algunos o todos los demás tejidos de la planta. Por ejemplo, el gen Ms45, descrito en la presente documentación, se detecta en las anteras durante el cuarteto, la liberación del cuarteto y las etapas uninucleares tempranas del desarrollo. Si se desea conocer detalles sobre las etapas del desarrollo de las anteras, véase Chang, M.T. y M.G. Neuffer, "Maize Microsporogenesis"; Genome; Vol. 32; págs. 232-244; (1989). La región reguladora con preferencia por tejidos masculinos del gen Ms45 dirige la expresión de un gen ligado operativamente en tejidos masculinos. Los tejidos preferidos para la expresión son los tejidos masculinos; pero no tejidos de raíz o coleoptilo. La expresión predominante se observa en los tejidos masculinos tales como, pero sin limitaciones, polen, tapete, antera, espiguilla, células madre del polen y microsporas. Esta expresión con preferencia por tejidos masculinos se refiere a niveles mayores de expresión en tejidos masculinos, pero no necesariamente a la exclusión de otros tejidos.

Intervenir significa influenciar de manera positiva o negativa o ejercer influencia sobre el resultado, por ejemplo en la fertilidad u otra característica.

La fertilidad masculina sufre un impacto cuando se experimenta una

fertilidad que no es normal; esto puede ser una fertilidad reducida o incrementada o una fertilidad diferente en términos del momento en que se produce o con otras características.

El término aislado significa alterado "por la mano del hombre" con respecto a su estado natural; es decir, que, si se produce en la naturaleza, ha sido modificado o eliminado de su ambiente natural o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido natural o un polipéptido que está presente naturalmente en un organismo vivo en su estado natural no está "aislado", pero ese mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales con los cuales coexiste en su estado natural está "aislado", en el sentido en que se emplea ese término en la presente documentación. Por ejemplo, con respecto a los polinucleótidos, el término aislado significa que está separado del cromosoma y la célula en la cual aparece en la naturaleza. Como parte del proceso de aislamiento o después de la misma, dichos polinucleótidos se pueden unir con otros polinucleótidos, tales como ADNc, por ejemplo para mutagénesis, para formar proteínas de fusión y para la propagación o expresión en un huésped. Los polinucleótidos aislados, ya sea solos o unidos con otros polinucleótidos tales como los vectores, se pueden introducir en células huésped, en cultivo o en organismos completos. Una vez introducidos en células huésped en cultivo o en organismos completos, dichos ADN aún estarían aislados, en el sentido en que se emplea ese término en la presente documentación, porque no se encontrarían en su forma o ambiente natural. De manera similar, los polinucleótidos y polipéptidos pueden aparecer en una composición, como por ejemplo formulaciones de medios, soluciones para la introducción de polinucleótidos o polipéptidos, por ejemplo, en células, composiciones o

soluciones para reacciones químicas o enzimáticas, como es el caso de las composiciones que no son naturales, y permanecen en ellas los polinucleótidos o polipéptidos aislados en el sentido en que se emplea ese término en la presente documentación.

Un gen exógeno se refiere, en la presente descripción, a una secuencia de ADN que es introducida o reintroducida en un organismo. Por ejemplo, cualquier gen, aún el gen estructural Ms45, es considerado un gen exógeno si dicho gen es introducido o reintroducido en el organismo.

## 2. **Aislamiento de una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos**

Si bien se conocen en el arte otros promotores y genes específicos de anteras que son activos en los tejidos masculinos (McCormick, et al., "Anther-Specific Genes: Molecular Characterization and Promoter Analysis in Transgenic Plants", en Plant Reproduction: From Floral Induction to Pollination, Lord et al., eds.; págs. 128-135; (1989); Scott et al., Publicación de Patente Internacional N° WO 92/11379 (1982); van der Meer et al., The Plant Cell, Vol. 4; pág. 253; (1992)), no existen principios o criterios estructurales aceptados en general para el reconocimiento de secuencias de ADN que confieran una expresión de tejido masculino a la expresión de genes en maíz. En consecuencia, no es posible aislar una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos directamente de una biblioteca genómica de maíz mediante una búsqueda de una secuencia consenso que confiera expresión con preferencia por tejidos masculinos.

Por ejemplo, la hibridización de dichas secuencias se puede llevar a cabo bajo condiciones de astringencia reducida, astringencia media o aún

condiciones de gran astringencia (por ejemplo, condiciones representadas por una astringencia de lavado de formamida 35-40% con solución de Denhardt 5X, SDS 0,5% y SSPE 1X a 37 °C; condiciones representadas por una astringencia de lavado de formamida 40-45% con solución de Denhardt 5X, SDS 0,5% y SSPE 1X a 42 °C; y condiciones representadas por una astringencia de lavado de formamida 50% con solución de Denhardt 5X, SDS 0,5% y SSPE 1X a 42 °C, respectivamente). Una astringencia media en una hibridización estándar de ácidos nucleicos será de utilidad para identificar las regiones reguladoras con preferencia por tejidos masculinos descriptas en la presente documentación así como otros genes (véase, por ejemplo, Sambrook J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; (1982)). En general, las secuencias que codifican una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos tienen una identidad de secuencia con la misma, preferentemente del 70%, 75% u 80%, con mayor preferencia, del 85% o 90% y con mayor preferencia aún, del 95% o 99%.

En el arte se encuentran disponibles métodos para la hibridización de secuencias de ácidos nucleicos. La búsqueda con hibridización de bibliotecas plaqueadas de ADN (véase, por ejemplo, Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; (1982)) o la amplificación de secuencias de codificación utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (véase, por ejemplo Innis, et al., PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications; Academic Press; (1990)) son técnicas bien conocidas para el aislamiento de ADN genómico.

Se pueden identificar regiones reguladoras en subclones genómicos

utilizando análisis funcional, verificado habitualmente por la observación de expresión de genes informantes en tejido de antera y la reducción o ausencia de expresión de genes informantes en tejidos que no pertenecen a la antera. Este enfoque general se ilustra en el Ejemplo 3, más adelante. La posibilidad de regiones de regulación que residan "hacia el extremo 5'" con respecto al sitio de inicio de la transcripción puede ser evaluado por subclonación de un fragmento de ADN que contenga dicha región hacia el extremo 5' y la subclonación de fragmentos pequeños en vectores de expresión para experimentos de expresión transiente. Se espera que fragmentos menores puedan contener las regiones esenciales para una expresión con preferencia por tejidos masculinos. Por ejemplo, las regiones esenciales de los promotores CaMV 19S y 35S fueron identificadas en fragmentos relativamente pequeñas derivadas de piezas genómicas mayores como se describe en la Patente de EE.UU. Nº. 5.352.605.

En general, las secuencias que codifican una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos tendrán una identidad de secuencia con la misma, preferentemente del 70%, 75% u 80%, con mayor preferencia, del 85% o 90% y con mayor preferencia aún, del 95% o 99%.

El análisis de supresión se puede efectuar tanto desde el extremo 5' como del extremo 3': los fragmentos se pueden obtener por mutagénesis con rastreo-ligadores, mutagénesis utilizando la reacción en cadena de la polimerasa y análogos (Directed Mutagenesis: A Practical Approach; IRL Press; (1991)). Las supresiones 3' pueden delinear la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos e identificar el extremo 3' de manera tal que esta región esencial se pueda ligar operativamente con un promotor nuclear de

elección. Una vez identificada la región esencial, la transcripción de un gen exógeno puede ser controlada por la región con preferencia por tejido masculino del Ms45 más un promotor nuclear. El promotor nuclear puede ser cualquiera de los promotores nucleares conocidos, tales como el promotor 35S o 19S del virus en mosaico de la coliflor (Patente de EE.UU. N°: 5.352.605), la ubiquitina (Patente de EE.UU. N°: 5.510.474), el promotor nuclear IN2 (Patente de EE.UU. N°: 5.364.780) o un promotor del virus en mosaico de la escrofularia (Gruber et al., "Vectors for Plant Transformation" en Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology; Glick et al., eds.; CRC Press; págs. 89-119; (1993)). El promotor es, con preferencia, el promotor nuclear de un gen con preferencia por tejidos masculinos o el promotor nuclear CaMV 35S.

Otros análisis mutacionales permiten introducir modificaciones en la funcionalidad, como en los niveles de expresión, en el momento de la expresión o en el tejido de expresión. Las mutaciones también pueden ser silentes y no presentar ningún efecto observable.

### 3. Inserción de la región en un vector de expresión

La selección de un vector de expresión adecuado con el cual evaluar la expresión funcional dependerá del huésped y del método de introducción del vector de expresión en el huésped y dichos métodos son bien conocidos por los expertos en el arte. Para los eucariontes, las regiones en el vector incluyen regiones que controlan la iniciación de la transcripción y el procesamiento. Estas regiones están ligadas operativamente con un gen informante como el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) o luciferasa. Las descripciones generales y los ejemplos de vectores de expresión y genes informantes vegetales se pueden encontrar en Gruber et al., "Vectors for Plant Transformation" en

RECIBIDO  
22 JUN 1993  
INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology; Glick et al., eds; CRC Press; págs. 89-119; (1993). Los vectores de expresión Gus y los casetes de genes Gus se pueden adquirir de Clontech, Palo Alto, CA, en tanto los vectores de expresión y casetes de genes de la luciferasa son comercializados por Promega Corporation, Madison, WI. Los plásmidos Ti y otros vectores de *Agrobacterium* se describen en Ishida Y. et al., Nature Biotechnology; Vol. 14; págs. 745-750; (1996) y en la Patente de EE.UU. N°: 5.591.616, Method for Transforming Monocotyledons, depositada el 3 de mayo, 1994.

Los vectores de expresión que contienen regiones reguladoras putativas localizadas en los fragmentos genómicos se pueden introducir en tejidos intactos, como anteras en distintas etapas, embriones o en callos. Los métodos para la distribución de ADN incluyen bombardeo con microproyectiles, inyección de ADN, electroporación y transferencia de genes mediada por *Agrobacterium* (véase, Gruber et al., "Vectors for Plant Transformation" en Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology; Glick et al., eds; CRC Press; (1993), Patente de EE.UU. N°: 5.591.616, Method for Transforming Monocotyledons, depositada el 3 de mayo, 1994 e Ishida Y. et al., Nature Biotechnology; Vol. 14; págs. 745-750; (1996). Los métodos generales para el cultivo de tejidos vegetales se pueden consultar en Gruber et al., "Vectors for Plant Transformation" en Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology; Glick et al., eds; CRC Press; (1993).

En un sistema de ensayo transiente, las anteras aisladas, en determinada etapa, se colocan inmediatamente sobre medio de cultivo para espiguillas (Pareddy, D. R. y J. F. Peelino, Crop Sci. J.; Vol. 29; págs. 1564-1566; (1989)) solidificado con Phytigel 0,5% (Sigma, St. Louis) u otro medio de

solidificación. El vector de expresión de ADN es introducido dentro de las 5 horas, con preferencia por distribución mediada por microproyectiles con partículas de 1,2  $\mu\text{m}$  a 1000-1100 Psi. Después de la distribución del ADN, las anteras se incuban a 26 °C sobre el mismo medio de cultivo para espiguillas durante 17 horas y se analizan preparando un homogenato de tejido completo y evaluando la actividad GUS o luciferasa (véase, Gruber et al., "Vectors for Plant Transformation" en Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology; Glick et al., eds; CRC Press; (1993).

Los métodos descriptos se utilizaron para identificar secuencias de ADN que regulan la expresión de genes con preferencia por tejidos masculinos. Una región tal se identificó como la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos Ms45 de longitud completa (SEQ ID N°: 1). En la SEQ ID N°: 2 se identifica una mutación TATA box que presenta identidad de secuencia con la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos Ms45 de longitud completa

Por consiguiente, la presente invención abarca una molécula de ADN cuya secuencia de nucleótidos se muestra en la SEQ ID N°: 1 (o aquellas que presentan identidad de secuencia) y que presenta la función de una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos.

El TATA box putativo se puede identificar por análisis de extensión con cebadores como se describe en el Ejemplo 2, más adelante, o en Current Protocols in Molecular Biology; Ausubel, F.M. et al., eds.; John Wiley and Sons; Nueva York; págs. 4.8.1-4.8.5; (1987).



#### 4. **Uso de la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos para controlar la fertilidad**

Uno de los objetivos de la presente invención es proveer un medio para controlar la fertilidad utilizando una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos. Cabe destacar que esta región reguladora con preferencia por tejidos masculinos puede controlar la expresión de un gen exógeno en las anteras de cuarteto hasta las etapas uninucleares del desarrollo. El significado práctico de dicha cronología es que la expresión de un gen inductor de esterilidad durante esta etapa del desarrollo, interrumpe la maduración de la antera en una etapa suficientemente temprana como para permitir una comprobación visual a campo de la función del sistema inductor de esterilidad. También puede reducir la posibilidad de que aparezcan "obstaculizadores" (anteras que liberan polen). Por consiguiente, los efectos del gen inductor de esterilidad serán evidentes en el campo de producción en una etapa suficientemente temprana como para permitir una eliminación, manual o mecánica, de las espiguillas de cualquier "escapada fértil" que se hubiera podido producir como consecuencia de una interrupción total o parcial del sistema inductor de esterilidad.

Un enfoque para controlar la fertilidad masculina es manipular la expresión de genes en el tapete. El tapete es una capa de células que rodea a las células microsporógenas en la antera y probablemente también les provee de nutrientes, tales como azúcares reductores, aminoácidos y lípidos, a las microsporas en desarrollo (Reznikova C.R. Acad. Bulg. Sci.; Vol. 31; pág. 1067; (1978); Nave et al., J. Plant Physiol.; Vol. 125; pág. 451; (1986); Sawhney et al., J. Plant Physiol.; Vol. 125; pág. 467; (1986)). Se encontró una gran expresión

del Ms45 en la capa del tapete. Las células del tapete también producen  $\beta(1,3)$ -glucanasa ("callasa") que promueve la liberación de las microsporas (Mephram et al., Protoplasma; Vol. 70; pág. 1; (1970)). Por eso, existe una delicada relación entre el tapete y las células microsporógenas y cualquier interrupción de la función del tapete muy probablemente dé como resultado granos de polen disfuncionales. De hecho, se sabe que las lesiones en la biogénesis del tapete da como resultado mutantes con esterilidad masculina (Kaul, "Male Sterility in Higher Plants" en Monographs on Theoretical and Applied Genetics; Frankel et al., eds.; Springer Verlag; Vol. 10; págs. 15-95; (1988). Una aparición temprana o tardía de callasa durante el desarrollo del tapete también está asociada con ciertos tipos de esterilidad masculina (Warmke et al., J. Hered.; Vol. 63; pág. 103; (1972)). Por lo tanto, se puede emplear el gen de la callasa para interrumpir la función del tejido masculino. Scott et al., PCT WO 93/02197, describen la secuencia de nucleótidos de una callasa específica del tapete. Por consiguiente, se puede inducir un error en el desarrollo de las microsporas en granos de polen maduros utilizando una molécula de ADN recombinante que comprenda un gen capaz de interrumpir la función del tapete bajo el control de secuencias reguladoras específicas del tapete.

Un enfoque general para provocar un impacto en la fertilidad masculina comprende la construcción de un vector de expresión en el cual la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos está ligada operativamente con una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína capaz de interrumpir la función del tejido masculino, dando como resultado la esterilidad. Las proteínas capaces de interrumpir la función del tejido masculino incluyen proteínas que inhiben la síntesis de las macromoléculas esenciales para la

función celular, enzimas que degradan las macromoléculas esenciales para la función celular, proteínas que alteran la biosíntesis o el metabolismo de las hormonas vegetales, proteínas estructurales, proteínas que se expresan inapropiadamente y proteínas que inhiben una función específica de los tejidos masculinos.

Por ejemplo, se puede construir un vector de expresión en el cual la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos está ligada operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica un inhibidor de la síntesis de proteínas, que puede ser, pero sin limitaciones, una citotoxina. La toxina de la difteria, por ejemplo es un inhibidor bien conocido de la síntesis de proteínas en eucariontes. Las moléculas de ADN que codifican el gen de la toxina de la difteria se puede obtener de la American Type Culture Collection (Rockville, MD), N° ATTC 39359 o N° ATTC 67011 y véase Fabijanski et al., Solicitud de Patente Europea N° 90902754.2, "Molecular Methods of Hybrid Seed Production" por ejemplos y métodos de uso. La DAM metilasa, por ejemplo, es una enzima bien conocida de *Escherichia coli* que modifica el residuo adenina en la secuencia 5' GATC 3' en N<sup>6</sup>-metiladenina. Guban y Albertsen describen la manera en que se podría utilizar la DAM metilasa para impactar sobre la fertilidad en plantas transgénicas (PCT/US95/15229, Guban, A.M. y Albertsen, M.C., "Reversible Nuclear Genetic System for Male Sterility in Transgenic Plants"). Otro ejemplo de una proteína que interrumpe la fertilidad es la avidina como se ilustra en la Solicitud de Patente de EE.UU. N°: 08/475.582, "Induction of Male Sterility in Plants by Expression of High Levels of Avidin" de Howard, J. y Albertsen, M.C.

Como alternativa, se puede lograr la interrupción de la función del tapete

utilizando secuencias de ADN que codifiquen enzimas capaces de degradar una macromolécula biológicamente importante. Por ejemplo, Mariani et al., Nature; Vol. 347; pág. 737; (1990) han mostrado que la expresión en el tapete de la ARNasa T1 de *Aspergillus oryzae* o una ARNasa de *Bacillus amyloliquefaciens*, denominada "barnasa", inducía la destrucción de células del tapete, dando como resultado la esterilidad masculina. Quaas et al., Eur. J. Biochem.; Vol. 173; pág. 617; (1988) describen la síntesis química de la ARNasa T1, en tanto la secuencia de nucleótidos del gen de la barnasa se describe en Hartley, J. Molec. Biol.; Vol. 202; pág. 913; (1988).

Los genes de la ARNasa T1 y la barnasa se pueden obtener, por ejemplo, sintetizando los genes con oligonucleótidos largos mutuamente cebadores. Véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology; Ausubel, F.M. et al., eds.; John Wiley and Sons; Nueva York; págs. 8.2.8 a 8.2.13; (1987). Véase también, Wosnick et al., Gene; Vol. 60; pág. 115; (1987). Más aún, las técnicas actuales que emplean la reacción en cadena de la polimerasa proporcionan la capacidad de sintetizar genes muy grandes (Adang et al., Plant Molec. Biol.; Vol. 21; pág. 1131; (1993); Barnbot, et al., PCR Methods and Applications; Vol. 2; pág. 266; (1993)).

En un enfoque alternativo, la producción de polen es inhibida con la alteración del metabolismo de hormonas vegetales, como las auxinas. Por ejemplo, el gen rolB de *Agrobacterium rhizogenes* codifica una enzima que interfiere con el metabolismo de la auxina catalizando la liberación de indoles libres de indoxil- $\beta$ -glucósidos. Estruch et al., EMBO J.; Vol. 11; pág. 3125 (1991) y Spena et al., Theor. Appl. Genet.; Vol. 84; pág. 520; (1992) han mostrado que la expresión específica del gen rolB en anteras de tabaco dio

como resultado plantas con anteras marchitadas en las cuales la producción de polen estaba severamente disminuida. Por consiguiente el gen *rolB* es un ejemplo de un gen que es de utilidad para controlar la producción de polen. Slightorn et al., J. Biol. Chem.; Vol. 261; pág. 108; (1985), describen la secuencia de nucleótidos del gen *rolB*.

Con el fin de expresar una proteína que interrumpa la función del tejido masculino, se construye un vector de expresión en el cual la secuencia de ADN que codifica dicha proteína está ligada operativamente a secuencias de ADN que regulan la transcripción del gen de forma preferencial en tejido masculino. Los requerimientos generales del vector de expresión ya se describieron en el contexto de un sistema de expresión transiente. Aquí, sin embargo, el modo preferido es introducir el vector de expresión en tejido embrionario vegetal de manera tal que la proteína exógena se expresará en una etapa posterior del desarrollo en los tejidos masculinos de una planta adulta. La estabilidad mitótica se puede lograr utilizando vectores virales vegetales que proveen una replicación epicromosómica.

Un método alternativo y preferido para obtener estabilidad mitótica consiste en integrar secuencias de vectores de expresión en el cromosoma del huésped. Dicha estabilidad mitótica se puede obtener por distribución con microproyectiles de un vector de expresión en tejido embrionario (Gruber et al., "Vectors for Plant Transformation" en Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology; Glick et al., eds; CRC Press; (1993)).

La metodología de transformación se puede encontrar para muchas plantas, incluyendo sin limitaciones: girasol, soja, trigo, canola, arroz y sorgo (Knittel et al., J. Plant Cell Rep.; Springer International, Berlín, Alemania; Vol

14(2/3); págs. 81-86; (1994); Chee, P.P. et al., Plant Physiol.; American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD; Vol. 91(3); págs. 1212-1218; (1989); Hadi, M.Z. et al., J. Plant Cell Rep.; Springer International, Berlín, Alemania; Vol. 15(7); págs. 500-505; (1996); Perl, A. et al., Molecular and General Genetics; Vol. 235(2-3); págs. 279-284; Zaghmout, O.M.F. y N.L. Trolinder, Nucleic Acids Res.; IRL Press, Oxford; Vol. 21(4); pág. 1048; (1993); Chen, J.L. y W.D. Beverdorf, Theor. Appl. Genet.; Springer International, Berlín, Alemania; Vol. 88(2); págs. 187-192; (1994); Sivarnani, E. et al., Plant Cell Rep.; Springer International, Berlín, Alemania; Vol. 15(5); págs. 322-327; (1996); Hagio, T. et al., Plant Cell Rep.; Vol. 10(5); págs. 260-264; (1991) y también son conocidas por los expertos en el arte.

Con el fin de seleccionar las células transformadas, el vector de expresión contiene un gen para un marcador de selección, tal como un gen de resistencia a un herbicida. Por ejemplo, dichos genes pueden conferir resistencia a fosfinotricina, glifosato, sulfonilurea, atrazina, imidazolinona o kanamicina. Si bien el vector de expresión puede contener secuencias de ADNc que codifiquen una proteína exógena bajo el control de una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos, así como el gen para un marcador de selección bajo el control del promotor constitutivo, el gen para un marcador de selección también se puede introducir en las células huésped en un vector de expresión de selección separado. Dicha "cotransformación" del tejido embrionario con un vector de expresión de prueba que contiene una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos y un vector de expresión de selección se ilustra más adelante.

### 5. Inducción de la esterilidad

En un enfoque alternativo, se puede inducir esterilidad masculina mediante el uso de un vector de expresión en el cual la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos está ligada operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una unidad nucleotídica complementaria. La unión de las moléculas de ácidos nucleicos complementarias a la molécula blanco se puede seleccionar de manera tal que es inhibidora. Por ejemplo, si el blanco es una molécula de ARNm, entonces la unión de una unidad de nucleótidos complementaria, en este caso un ARNm, da como resultado una hibridación y la detención de la traducción (Paterson et al., Proc. Natl Acad. Sci., Vol. 74, pág. 4370; (1987)). Por lo tanto, una molécula de ARN antisentido adecuada, como una que sea complementaria al Ms45 (Patente de EE.UU. N° 5.478.369), tendría una secuencia complementaria a la de una especie de ARNm que codifica una proteína necesaria para la esterilidad masculina (Fabijanski en "Antisense Gene Systems of Pollination Control For Hybrid Seed Production", Solicitud de Patente de EE.UU. N° 08/288.734).

Por ejemplo, la producción de ARN antisentido de callasa inhibirá la producción de la enzima callasa que es esencial para la liberación de las microsporas. Además, la esterilidad masculina puede ser inducida por medio de la inhibición de la biosíntesis de flavonoides utilizando un vector de expresión que produzca ARN antisentido para la región no traducida 3' del gen de la chalcona sintetasa A (Van der Meer et al., The Plant Cell, Vol. 4, pág. 253; (1992)). La clonación y caracterización del gen de la chalcona sintetasa A fueron descritas por Koes et al., Gene, Vol. 81, pág. 245; (1989) y por Koes et al., Plant Molec. Biol., Vol. 12, pág. 213; (1989).

Corno alternativa, se puede construir un vector de expresión en el cual la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos está ligada operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una ribozima. Las ribozimas se puede diseñar de manera tal que expresen actividad endonucleasa dirigida a una determinada secuencia blanco en una molécula de ARNm. Por ejemplo, Steinecke et al., EMBO J.; Vol. 11; pág. 1525; (1992), logró hasta un 100% de inhibición de la expresión del gen de la neomicina fosfotransferasa por ribozimas en protoplastos de tabaco. Más recientemente, Perriman et al., Antisense Research and Development; Vol. 3; pág. 253; (1993), inhibieron la actividad cloramfenicol acetiltransferasa en protoplastos de tabaco utilizando un vector que expresaba una ribozima cabeza de martillo modificada. En el contexto de la presente invención, las moléculas ARN blanco apropiadas para ribozimas incluyen especies de ARNm que codifican proteínas esenciales para la fertilidad masculina, tal como ARNm de callasa y ARNm del Ms45.

En otro enfoque alternativo, se pueden construir vectores de expresión en las cuales la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos dirige la producción de transcritos de ARN capaces de promover el clivaje mediado por ARNasa-P de moléculas de ARNm específicas. De acuerdo con este enfoque, se puede construir una secuencia guía externa para dirigir la ribozima endógena, ARNasa-P, hacia una especie particular de ARNm intracelular que es clivada a continuación por la ribozima celular (Patente de EE.UU. Nº: 5.168.056; Yuan et al., Science; Vol. 263; pág. 1269; (1994)). Se prefiere que la secuencia guía externa comprenda una secuencia de diez a quince nucleótidos complementarios a una especie de ARNm, que codifica una proteína esencial para la fertilidad masculina, y una secuencia de nucleótidos 3'-RCCA, donde R



es, preferentemente, una purina. Los transcritos de la secuencia guía externa se unen a las especies de ARNm específica por formación de pares de bases entre el ARNm y las secuencias guía externas complementarias, promoviendo de esta manera el clivaje del ARNm por la ARNasa-P en el nucleótido localizado del lado 5' de la región de bases apareadas.

Otro enfoque alternativo consiste en utilizar tecnología de aptámeros, donde la unidad nucleotídica complementaria es un nucleótido que sirve como ligando para una molécula blanco específica (Patente de EE.UU. N°: 5482841). Este blanco podría ser un producto esencial para la fertilidad masculina o un producto que interrumpa la fertilidad masculina. Con este método se podría seleccionar un aptámero para la molécula blanco, por ejemplo Ms45 o avidina, que podría unir e inhibir la expresión del blanco. La secuencia de nucleótidos que codifica el aptámero formaría parte de los vectores de expresión contruidos de manera tal que una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos dirija la producción de dicho aptámero.

La esterilidad también puede ser inducida por la interrupción de un gen que sea importante en la fertilidad masculina, como el gen Ms45 o Ms2 (Mark, G.M. et al., Nature; Vol. 363; págs. 715-717; (1993)). Los métodos para interrumpir genes son bien conocidos en el arte e incluyen, sin limitaciones, la inserción de elementos que se pueden transponer e inducción de mutaciones.

#### **6. Restablecimiento de la fertilidad masculina en el híbrido F1**

Los métodos descriptos anteriormente se pueden emplear para obtener plantas con maíz transgénicas con esterilidad masculina para la producción de híbridos F1 en cruzamientos entre líneas endogámicas dirigidos a gran escala. Si las células huevo de las plantas transgénicas con esterilidad masculina no

contienen todas al gen exógeno que interrumpe la función del tapete, entonces una proporción de los híbridos F1 tendrá el fenotipo de fertilidad masculina. Por otro lado, los híbridos F1 tendrán el fenotipo de esterilidad masculina si el gen exógeno está presente en todas las células huevo de las plantas transgénicas con esterilidad masculina porque la esterilidad inducida por el gen exógeno sería dominante. Por lo tanto, sería conveniente utilizar un sistema de restablecimiento de la fertilidad masculina con el fin de proveer la producción de híbridos F1 con fertilidad masculina. Dicho sistema de restablecimiento de la fertilidad posee un valor especial cuando el producto cosechado es la semilla o cuando los cultivos se autopolinizan.

Además, dicho sistema de restablecimiento de la fertilidad también tiene un valor particular cuando la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos está ligada operativamente a un promotor inducible, como en la publicación WO 89/10396 (Marianai et al., Plants with Modified Stamen Cells) y dicho promotor inducible responde a controles externos. Esta región reguladora con preferencia por tejidos masculinos ligada consiste de una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos, un promotor inducible y un gen exógeno.

Un enfoque para el restablecimiento de la fertilidad masculina sería cruzar plantas transgénicas con esterilidad masculina con plantas transgénicas con fertilidad masculina que contenga un gen de restablecimiento de la fertilidad bajo el control de una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos. Por ejemplo, Fabijanski en "Antisense Gene Systems of Pollination Control For Hybrid Seed Production", Solicitud de Patente de EE.UU. N°: 08/288.734, cruzó las plantas con fertilidad masculina que expresaban un

inhibidor de la barnasa, denominadas "barstar", con plantas con esterilidad masculina que expresaban barnasa. Hartley, J. Mol. Biol.; Vol. 202; pág. 213; (1988), describe la secuencia de nucleótidos de barstar.

Otro enfoque sería cruzar plantas con esterilidad masculina que contienen una interrupción en un gen de fertilidad masculina esencial, con plantas con fertilidad masculina que contienen la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos ligada operativamente a una copia no interrumpida del gen de la fertilidad, como el gen Ms45 o Ms2. La secuencia completa del gen Ms45 está contenida en la Patente de EE.UU. N°: 5:478.389 y el gen Ms2 en Mark, G.M. et al, Nature; Vol. 363; págs. 715-717; (1993).

Como alternativa, el restablecimiento de la fertilidad masculina se puede lograr mediante la expresión de unidades nucleotídicas complementarias, tales como ribozimas de toxinas o aptámeros, en plantas con fertilidad masculina con el fin de neutralizar los efectos de la toxina en las plantas con esterilidad masculina. Por lo tanto, se puede restablecer la fertilidad en los híbridos F1 produciendo una planta transgénica de fertilidad masculina que sintetiza una especie particular de molécula de ARN o polipéptido para contrarrestar los efectos del gen exógeno particular expresado en las plantas transgénicas con esterilidad masculina.

En un método alternativo para restablecer la fertilidad masculina, las plantas transgénicas con esterilidad masculina contienen un vector de expresión, que posee una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos, una región reguladora procarionte (de un sistema regulador procarionte) y un gen exógeno, que es capaz de interrumpir la función del tapete. Se producen plantas transgénicas de fertilidad masculina que expresan

un péptido procarionte bajo el control de una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos. En los híbridos F1 resultantes del cruzamiento entre plantas con fertilidad masculina y plantas con esterilidad masculina, el péptido procarionte se une a la secuencia reguladora procarionte y reprime la expresión del gen exógeno que tiene la capacidad de interrumpir la fertilidad masculina. Una ventaja de este método de restablecimiento de la fertilidad es que una forma de la planta transgénica de fertilidad masculina se puede emplear para proporcionar fertilidad a la F1, sin tener en cuenta la identidad del gen exógeno que se utilizó para interrumpir la función del tapete en la planta transgénica con esterilidad masculina.

Por ejemplo, el sistema gen LexA/operador LexA se puede utilizar para regular la expresión de genes que se busca en la presente invención. Véase la Patente de EE.UU. N°: 4.833.080 y Wang et al., Mol. Cell Biol.; Vol. 13; pág. 1805; (1993). Más específicamente, el vector de expresión de la planta con esterilidad masculina contiene la secuencia del operador LexA, en tanto el vector de expresión de la planta con fertilidad masculina contiene las secuencias de codificación del represor LexA. En el híbrido F1, el represor LexA se unirá a la secuencia del operador LexA e inhibirá la transcripción del gen exógeno que codifica un producto capaz de interrumpir la fertilidad masculina. Ellos comprenden, sin limitaciones, avidina, DAM metilasa, toxina de la difteria, ARNasa-T, barnasa, rolB y chalcona sintetasa A.

Las moléculas de ADN del operador LexA se pueden obtener, por ejemplo, sintetizando fragmentos de ADN que contienen la secuencia del operador LexA bien conocida. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N°: 4.833.080 y Garriga et al., Mol. Gen. Genet.; Vol. 236; pág. 125; (1992). El gen

LexA se puede obtener sintetizando una molécula de ADN que codifique al represor LexA. Las técnicas de síntesis de genes se trataron anteriormente y las secuencias del gen LexA fueron descritas, por ejemplo, por Garriga et al., Mol. Gen. Genet.; Vol. 236; pág. 125; (1992). Como alternativa, las moléculas de ADN que codifican al represor LexA se pueden obtener del plásmido pRB500, American Type Culture Collection, N° Acceso 67758. Los expertos en el arte pueden disponer fácilmente de otras estrategias para restablecer la fertilidad masculina utilizando sistemas reguladores procariontes, tal como el sistema de operón lac/represor lac o el sistema de operón trp/represor trp.

#### 7. **Identificación de partes esenciales de la región reguladora**

La identificación de partes esenciales de la región reguladora se puede llevar a cabo mediante la supresión, adición y/o sustitución de nucleótidos en la región reguladora por métodos bien conocidos por los expertos en el arte. Dichas variantes se pueden obtener, por ejemplo, por mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, mutagénesis con rastreo-ligadores y mutagénesis utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (Directed Mutagenesis: A Practical Approach; IRL Press; (1991)).

Se puede construir una serie de supresiones 5' de una región reguladora utilizando los sitios de restricción existentes. Se puede evaluar la actividad de los fragmentos de promotor resultantes utilizando un vector de expresión como se discutió anteriormente. Se puede lograr un refinamiento y una delineación adicionales haciendo cambios más pequeños, con preferencia de 50 ó 30 nucleótidos, con mayor preferencia de 20 ó 10 nucleótidos y con mayor preferencia aún de 5 ó 1 nucleótidos, en el fragmento de restricción más pequeño que aún confiera una expresión apropiada sobre la construcción

informante (Directed Mutagenesis: A Practical Approach; IRL Press; (1991)). Estos se pueden introducir en el vector de expresión utilizando sitios de restricción introducidos o naturales. También se puede generar una serie de supresiones 3' como se discutió anteriormente o por PCR o por los métodos bien conocidos por los expertos en el arte (Directed Mutagenesis: A Practical Approach; IRL Press; (1991)). Se puede lograr un refinamiento y una delineación adicionales haciendo cambios más pequeños, con preferencia de 50 ó 30 nucleótidos, con mayor preferencia de 20 ó 10 nucleótidos y con mayor preferencia aún de 5 ó 1 nucleótidos, en el fragmento de restricción más pequeño que aún confiera una expresión apropiada sobre la construcción informante (Directed Mutagenesis: A Practical Approach; IRL Press; (1991)).

Por ello las supresiones 5' y 3' van a delinear la región mínima esencial y temporal apropiadas, de la región reguladora más larga, para limitar la expresión de tejido. En general, las secuencias que codifican esta región mínima de una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos tendrá una identidad de secuencia con la misma, preferentemente del 70%, 75% u 80%, con mayor preferencia, del 85% o 90% y con mayor preferencia aún, del 95% o 99%.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención.

#### **EJEMPLO 1**

##### **Clonación y secuenciación genómicas del promotor Ms45**

La identificación y marca Ac del ADNc Ms45 y el análisis Northern se describen en la Patente de EE.UU. Nº: 5.478.369.

Se utilizó un ADNc parcial del Ms45 para rastrear la biblioteca genómica

de maíz B73. Esta biblioteca se elaboró clonando SAU3A1 parciales en un vector de clonación genómico digerido con BAMHI (Lambda Dash II, Stratagene, La Jolla, CA). Se rastrearon aproximadamente  $1 \times 10^6$  placas utilizando una cepa de *E. coli* apropiada para ADN genómico (ER1647, New England Biolabs, MA) como huésped. El clon AC4.1 se purificó hasta homogeneidad después de tres rondas de rastreo. El mapeo por restricción del AC4.1 mostró que el clon era de 13 kb aproximadamente de longitud y que contenía dos sitios BAMHI internos (Figura 1). Uno de estos sitios también se encontró en el ADNc parcial del Ms45. Se subclonaron dos fragmentos BAMHI en un vector de clonación (Bluescript SK+, Stratagene, La Jolla, CA). El clon del extremo 5' era de aproximadamente 3,5 kb de longitud y correspondía a la secuencia hacia el extremo 5' del sitio BAMHI interno. El clon del extremo 3' era de aproximadamente 2,5 kb y contenía la secuencia Ms45 hacia el extremo 3' del sitio BAMHI interno. Al mismo tiempo se aisló y secuenció un ADNc Ms45 de longitud completa putativo. La comparación de las secuencias del clon del extremo 5' con el ADNc Ms45 permitió identificar el sitio putativo de inicio de la traducción (Figura 1).

La secuenciación de la región promotora Ms45 se llevó a cabo utilizando el método de terminación de cadena dideoxi de Sanger, F. et al., "DNA Sequencing with Chain Terminating Inhibitors", *Proc. Natl Acad. Sci.*, Vol. 74; págs. 5463-5467; (1977). Se secuenció el clon genómico pac4.1-5' (Figura 1) utilizando el oligo universal y otros que eran específicos para la secuencia utilizando las técnicas bien conocidas en el arte.

La región reguladora con preferencia por tejidos masculinos tenía un sitio NCOI introducido en el codón de inicio y se clonó como un fragmento

NCOI en un vector de expresión Luci sin promotor. Este nuevo vector informante se denominó plásmido PHP6045 (Figura 2) N° ATCC 97828 (depositado el 12 de diciembre, 1996; American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852).

## EJEMPLO 2

### Análisis por extensión con cebadores

Se aisló ARN total de espiguillas de maíz que contenían anteras desde la etapa de cuarteto hasta la etapa uninuclear temprana. El ARN total se precipitó con etanol y  $MgCl_2$ . Se aisló un miligramo de ARN total y se purificó el poli A+ ARNm utilizando celulosa oligo-dT. También se aisló el poli A+ ARNm directamente de hojas de plántulas de maíz de 6 días y de anteras de maíz utilizando los protocolos conocidos por los expertos en el arte.

Se preparó un escalonamiento secuenciador utilizando un oligonucleótido Ms45 de una sola cadena e incorporación de  $^{35}S$ -dATP en un procedimiento de secuenciación estándar, con los protocolos bien conocidos por los expertos en el arte.

La extensión con cebadores se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente método:

- I. Cebador oligonucleotídico sintético marcador del extremo 5'.

Se combinó: 5 pmol del cebador N11916 (PHL11916) en 1,0  $\mu$ l:

5  $\mu$ l (50  $\mu$ Ci)  $^{32}P$ -ATP gamma (> 5000 Ci/mmol)

0,7  $\mu$ l buffer quinasa 10X

0,7  $\mu$ l T4 polinucleótido quinasa

Se incubó a 37 °C, 45 min.

Se diluyó con 20  $\mu$ l de TE y se calentó a 65 °C para inactivar la enzima.



Buffer quinasa 10X	Hasta completar 1 ml
Tris-HCl 0,5 M, pH 7.6-8.0	0,5 ml de 1M
Espermidina 5 mM	0,05 ml de 0,1 M
MgCl <sub>2</sub> 100 mM	0,1 ml de 1M
DTT 100 mM	0,5 ml de 0,5M
Gelatina o BSA 0,1 mg/ml	50 µl de 2 mg/ml
	0,1 ml de agua

## II. Alineación de cebadores y ARN

Los cebadores quinasa se alinearon con ARNm de espiguilla de maíz, hojas de plántulas de maíz de 6d, anteras de maíz y hojas de maíz de 6d. Se mezclaron sobre hielo 2 µl de ARNm, 1 µl de oligo sometido a quinasa, 2 µl de buffer de alineación 5X (KCl 1,25 M, Tris 10 mM, pH 7.9-8.15) y 1 µl de vanadilo 30 mM. El volumen total se llevó a 10 µl con Tris 10 mM, pH 8.15. Esta mezcla se calentó a 65 °C y se enfrió hasta 55 °C sobre un período de 4 horas sobre un bloque de calentamiento del termociclador.

## III. Extensión con cebadores

Se añadieron 23 µl de mezcla de extensión de cebadores (véase la receta más adelante) y 0,4 µl de transcriptasa inversa (SuperScript, BRL, MD) a cada tubo. Esto se mezcló pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo y se colocó inmediatamente a 48 °C y se incubó durante 45 min. La mezcla de extensión de cebadores consta de MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 5 mM, 0,33 mM de cada uno de: dATP, dCTP, dGP, dTTP; y agua DEPC.

Se añadieron 300 µl de etanol y se precipitó en un congelador a -20 °C durante toda la noche, luego se formó un pellet por microcentrifugación durante 30 minutos. Los pellets se secaron en un equipo Speed Vac y se disolvieron en

6 µl de 0,1 NaOH/EDTA 1 mM. El contenido de los tubos se mezcló por pipeteo y vortexeo con el fin de asegurar que los pellets se redisolvieran. Se dejaron a temperatura ambiente durante 2,5 horas y se agregaron 6 µl de colorante de secuenciación (Solución de detención del kit (juego) USS Sequencing) y la solución se desnaturalizó a 95 °C aproximadamente. La mitad de la muestra se cargó sobre gel de secuenciación de poliacrilamida desnaturalizante 6% con buffer concentrador y se corrió a 55 wats durante 2 horas. El gel se secó en un secador de geles y se expuso a una película Kodak X-AR. Después de tres días de exposición, se observó el producto de la transcripción en la reacción de extensión con cebadores de ARNm de espiguilla que correspondía a una desoxitimidina localizada 42 nucleótidos hacia el extremo 5' del codón de inicio (Figura 3). Esta posición se denominó +1. También se identificó un sitio de inicio de transcripción menor en -3.

### Ejemplo 3

#### Determinación de la especificidad de tejido y de etapa de la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos Ms45

La región reguladora con preferencia por tejidos masculinos de longitud completa (SEQ ID N°: 1) se fusionó con el gen informante luciferasa de la luciérnaga, *Photinus pyralis*, (DeWit, T.R. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.; Vol. 82; págs. 7870-7873; (1985)) con la región no traducida 3'-PinII de papa (Ácidos nucleicos, G. et al., "Functional Analysis of the 3' Control Region of the Potato Wound-Inducible Proteinase Inhibitor II Gene"; Plant Cell; Vol. 1; págs 115-122; (1989)). Se plaquearon anteras de maíz en varias etapas de desarrollo sobre medio de cultivo para espiguillas (Paredy et al., Theoret. Appl. Genet.; Vol. 77; págs. 521-526; (1989)), solidificado con agar (Phytagar®).

Sigma, St. Louis). Se determinó la etapa de una de las tres anteras de cada flor y las anteras restantes se agruparon por etapa y se plaquearon para el bombardeo con microproyectiles, típicamente a razón de ocho anteras por placa. Las anteras fueron bombardeadas a 1100 psi con partículas de tungsteno de 1,8  $\mu$  sobre las cuales se había precipitado ADN de la construcción informante de luciferasa-región reguladora con preferencia por tejidos masculinos Ms45. Todas las anteras sobre una placa dada se encontraban en la misma etapa: premeiótica, meiosis I, meiosis II, cuarteto, liberación de microsporas, microspora uninuclear temprana o microspora uninuclear mediana. Se efectuaron tres repeticiones de bombardeo en cada etapa. Las anteras se incubaron durante toda la noche a 26 °C durante 18 hs. Se preparó un extracto crudo con las anteras de cada placa y se evaluó la actividad luciferasa y contenido de proteínas del mismo. La actividad luciferasa, normalizada con la concentración de proteínas, se grafica en la Figura 4 como una función de la etapa del desarrollo. La mayor actividad se observó en las etapas de desarrollo de cuarteto y liberación de microsporas, con menor actividad en las etapas meiosis I y II y actividad escasamente detectable en la etapa uninuclear temprana. No se observó actividad significativa sobre el nivel basal en las anteras en etapa premeiótica o uninuclear mediana.

Además se bombardearon callos embriogénicos cultivados sobre medio MS que contenía 2,4-D 2,0  $\mu$ g/ml de la misma manera, excepto que fue a 650 psi, con partículas recubiertas con un informante luciferasa fusionado a la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos Ms45 o a un promotor de ubiquitina de maíz (Patente de EE.UU. N°: 5.510.474) y un informante uidA (GUS) fusionado al promotor de ubiquitina de maíz. La luciferasa se normalizó

con la  $\beta$ -glucuronidasa. Tal como se muestra en la Figura 5, la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos Ms45 no era capaz de dirigir la expresión transiente en callos embriogénicos y brotes, aún cuando se expresaba el promotor ubiquitina. De manera similar, semillas de maíz, embebidas y germinadas en agua destilada durante dos días y colocados sobre filtros húmedos, fueron sometidas a bombardeo con microproyectiles y se evaluaron los hipocotilos de los mismos por luciferasa y  $\beta$ -glucuronidasa. La región reguladora de la ubiquitina (promotor) estaba activa, pero la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos Ms45 no lo estaba.

Este resultado es coincidente con los resultados del análisis de hibridación de ARN. Se recogieron anteras de maíz en varias etapas de desarrollo y se trataron de la siguiente manera. Se fijó una de las tres anteras de cada flor en etanol:ácido acético glacial, 3:1, en una cavidad de una placa para microtitulación y dos se congelaron en nitrógeno líquido en una cavidad en la posición correspondiente en otra placa para microtitulación. Se determinaron los estadios de las anteras fijadas: luego se agruparon las anteras congeladas correspondientes por estadio y se aisló el poli A+ ARN de 20 anteras (kit (juego) RNA Micro-Quick Prep, Pharmacia, Uppsala, Suecia). Se sometieron volúmenes idénticos de ARN de anteras de cada uno de los estadios agrupados a electroforesis sobre gel de agarosa al 1,2% en buffer MOPS + formaldehído. Las muestras de ARN fueron transferidas a una membrana de nylon, se fijó por entrecruzamiento UV (Stratalinker, Stratagene Inc., La Jolla) y se hibridizaron con un fragmento de sonda marcada con  $^{32}\text{P}$  que consistía de toda la región de codificación del ADNc Ms45 y la región 3'. Los resultados que se muestran en la Figura 4 confirman el estado estable del transcripto Ms45

detectable en las etapas de cuarteto a uninuclear temprana y posiblemente tan temprano como, pero no menos temprano que, la telofase II en la meiosis. Cualquiera de los niveles de transcritos resultantes de la actividad de la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos durante la meiosis no se acumulan los suficientes compuestos para ser detectados por hibridización ARN o bien, la actividad de la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos en etapa meiótica observada en los ensayos transientes no tiene lugar en plantas.

Por consiguiente, se determinó que la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos Ms45 (SEQ ID N°: 1) presentaba expresión con preferencia por tejidos masculinos desde por lo menos la etapa de cuarteto hasta la etapa de liberación del cuarteto en el desarrollo de las anteras, con una posible expresión de bajo nivel en las etapas meiótica y uninuclear temprana.

#### EJEMPLO 4

##### Análisis con TATA box

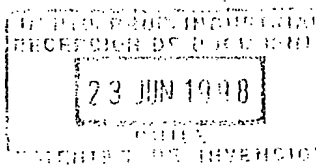
Dentro del fragmento de 1386 bp de ADN que codifica la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos Ms45, el sitio de inicio de transcripción más importante se identificó en la posición +1, un sitio de inicio de transcripción menor se identificó en la posición -3 con relación al sitio de inicio de transcripción más importante y se identificó un TATA box en la posición -33 (CATTAAG). Se observó que la secuencia TAAAGAT en la posición -30 también podía ser una candidata para el TATA box real. Este fragmento de 1388 bp se ligó operativamente con un casete de gen informante que comprendía la región de codificación de la luciferasa de la luciérnaga (Paredly

et al., Theoret. Appl. Genet.; Vol. 77; págs. 521-526; (1989) seguido de la región no traducida 3' del gen del inhibidor de proteinasa II de papa. (Ácidos nucleicos, G. et al., "Functional Analysis of the 3' Control Region of the Potato Wound-Inducible Proteinase Inhibitor II Gene", Plant Cell; Vol. 1; págs. 115-122; (1989).

Una manera bien conocida en el arte de analizar los TATA box es por medio de mutaciones. En otro derivado, se cambiaron de uno a seis nucleótidos del TATA box putativo en un derivado dado. Se introdujo un sitio BGLII en la posición -38 alterada con el TATA box putativo de CATTAAA en TATTAAA, que es una coincidencia más cercana a la secuencia del TATA box canónico TATAA.

El experto en el arte comprenderá que ciertas sustituciones dentro del TATA box pueden afectar el nivel de expresión del promotor sin ejercer influencia alguna sobre la especificidad de tejido. Tal como se muestra en la Figura 7, el cambio en el TATA box asociado con el sitio BGLII introducido en la posición -38 incrementó dramáticamente los niveles de expresión transiente en anteras y sugiere además que la secuencia en la posición -33 es el TATA box auténtico. La introducción de un sitio BGLII en las posiciones -40, -43, -51 ó -53 no incrementó la actividad del promotor (no se muestran los datos), lo cual prueba que el incremento observado en el sitio de introducción BGLII, -38 no guarda relación con el sitio BGLII per se.

Se introdujeron otras modificaciones del TATA box putativo para evaluar aún más su funcionalidad. La alteración de la secuencia putativa del TATA box de CATTAAA a GATTAAA, CATGGAA o GGGCCCA, redujo en todos los casos el nivel de expresión transiente en las anteras, lo cual sugiere además la



importancia de esta secuencia como TATA box. Inesperadamente, ninguna de estas mutaciones abolió la actividad transiente; sin embargo, se ha informado la existencia de actividad transiente en otros sistemas en ausencia de una secuencia tipo TATA y aún de promotores sin TATA (Guan, L. y J.G. Scandalios, Plant J.; Vol. 3; págs. 527-536; (1993); Close, P.S., "Cloning and Molecular Characterization of Two Nuclear Genes for *Zea mays* Mitochondrial Chaperonin 60", (Disertación); Universidad del Estado de Iowa, Ames, Iowa; págs. 92-128; (1993)).

En tanto todo lo mencionado anteriormente describe las realizaciones preferidas de la invención, los expertos en el arte comprenderán que se pueden efectuar variaciones y modificaciones y aún pertenecen al alcance de la invención.

RECEIVED  
23 JUN 1993  
U.S. DEPT. OF COMMERCE  
PATENT & TRADEMARK OFFICE

LISTADO DE SECUENCIAS

## (1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE: Pioneer Hi-Bred International, Inc.

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: REGIÓN REGULADORA CON PREFERENCIA POR TEJIDOS MASCULINOS Y MÉTODO PARA EL USO DE LA MISMA

(iii) CANTIDAD DE SECUENCIAS: 2

(iv) DOMICILIO POSTAL:

(A) DESTINATARIO: PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.

(B) CALLE: 800 Capital Square, 400 Locust Street

(C) CIUDAD: Des Moines

(D) ESTADO: Iowa

(E) PAÍS: EE.UU.

(F) ZIP: 50309

(iv) FORMATO DE LECTURA EN COMPUTADORA:

(A) TIPO DE MEDIO: DISQUETE

(B) COMPUTADORA: PC IBM COMPATIBLE

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release N° 1.0, Versión N° 1.30

(v) DATOS ACTUALES DE LA SOLICITUD:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT sin asignar

(B) FECHA DE DEPÓSITO: concurrentemente con la presente documentación

(C) CLASIFICACIÓN:

(vii) INFORMACIÓN SOBRE ABOGADO/AGENTE:

(A) NOMBRE: Sweeney, Patricia A.

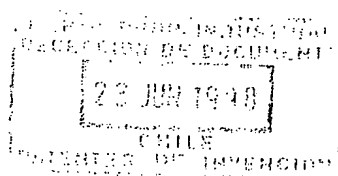
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 32.733

(C) NÚMERO DE REFERENCIA/DEPÓSITO: 0578-PCT

(ix) INFORMACIÓN SOBRE TELECOMUNICACIONES:

(A) TELÉFONO: (515) 248-4800

(B) TELEFAX: (515) 334-6883





## (2) INFORMACIÓN SOBRE LA SEQ. ID. NO. 1:

## (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1394 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID Nº: 1

CCATGGTGTG TCTATGAAAA AGATGAATAC AATGTGTCTA TATCGTTTT CTTAGGGTCC	60
CTTCTTCTGC CTTATTACTG ACTGAATCGG GGTACAAAA AACTCCACG GGTGCATGAT	120
CTCCATGTTT CACTTCTCCC ACCTCGCGTT GCACATTTCT TGGATGTGG TGGTTCCTCAT	180
CTGACCGAGG CCCATCAGAC ACCTTTGCGG ACACCCATCA AGGGCCTTTC GGATGGCCCA	240
CGAGACGTAT CGGGTCCTGG TGAATCCAGGG GATATATGTC CCCACAAATC GTACCTATA	300
TTATTATTCT TTAGATATTA TTTAATTTTT GGAAATATAA CAAACTTATA CTTTGTGTA	360
GGGCTCAGC ATAGATTTTC GCTTAGGGCC CAGAAATCGG AGGACCAGCC ATGTCTAGTG	420
TCCACTATTG GCACTACCCA GAACAAGATT TAAAAAATA ACCAAAGTAA CTAATCCACT	480
CGAAAGCTAT CATGTAATGT TTAAGAAAC ATCTATTAAA ACCAGCATCC TCTTAAAAA	540
CAAGCATATT TCGAAAGAGA CAAATTATGT TACAGTTTAC AACATCTAA GAGCGACAAA	600
TTATATCGAA AGGTAAAGTA TGACGTTGAG ATTTTCTTTT TCAATCTTG TTATTTTGT	660
ATTGTTTTTA TATACATTTT CTCTCTTAC AATAGATGA TTTCTTCCG ATTTTATAAA	720
ATGACTATAA AGTCATTTT ATATAAGAGC ACGCATGTCG TAGATTCTCG TTCAAAAATC	780
TTTCTGATTT TTTTAAAGAG TACTTTGGCA ACCCTGTTTC TTTCAAAGAA TTTTGATTT	840
TTCAAAAAAA ATTAGTTTAT TTTCTCTTA TAAATAGAA AACACTTAGA AAAATAGAGT	900
TGCCAGACTA GGCCTAQAAT GTTTTCCCAA TAAATTACAA TCACTGTGTA TAATTATTTG	960
GCCAGCCCA TAAATTATTT AAACCGAAAC TGAATCGAG CGAAACCAAA TCTGAGCTAT	1020

INSTITUTO VENEZOLANO  
 DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
 23 JUN 1980  
 10:10 AM

TTCTCTAGAT TAGTAAAAAG GGAGAGAGAG AGGAAGAAAT CAGTTTAAAG TCATTGTCCC 1080  
 TGAGATGTGC GGTGGGCA CGATAGGCAC CGTAATCATA GCTCATAGGT GCCTACGTCA 1140  
 GGTTCGGCAG CTCTCTGTC ATCTCACATG GCATACTACA TGCTTGTCA ACCGTTCTGC 1200  
 TTGTTCCATC GTCCAAGCCT TGCCTATTCT GAACCAAGAG GATACCTACT CCCAAACAAT 1260  
 CCATCTTACT CATGCAACTT CCATGCAUAC ACCACATAT GTTCCTGAA CCAATCCATT 1320  
 AAAGATCACA ACAGCTAGCG TTCTCCGCT AGCTTCCCTC TCTCTCTGC CGATCTTTT 1380  
 CGTCCACCAC CATG 1394  
 (2) INFORMACIÓN SOBRE LA SEQ. ID. NO. 2:  
 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
 (A) LONGITUD: 1394 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) CADENA: simple  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal  
 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID Nº: 2  
 CCATGGTGTG TCTATGAAA AGATGAGTAC AATGTGTCTA TATCGTTTT CTTAGGGTCC 60  
 CTCTCTCTGC CTTATTACTG ACTGAATCGG GGTACAAA AACTTCCAGG GGTGCATGAT 120  
 CTCCATGTC CACTTCTCCC ACCTGGCGTT GCACATTCTT TGGATGTGG TGGTCCCAT 180  
 CTGACCGAGG CCGATCAGAC ACCTTTCTGG ACACCCATCA AGGACCTTTC GGATGGCCCA 240  
 CGAGACGTAT CGGGTCTGG TGATCCAGGG GATATATGTC CCCACAATC GTCACCTATA 300  
 TTATTATTCT TTAGATATTA TTTAATTTT GGAAAATAA CAACTTATA CTTTGTGTA 360  
 GGGCTCAGC ATAGATTTTC GCTTAGGGCC CAGAAATGCG AGGACCAGCC ATGTCTAGTG 420  
 TCCACTATTG GCACTACCCA GAACAAGATT TAAAAAATA ACCAAAGTAA CTAATCCACT 480

CGAAAGCTAT CATGTAATGT TTAAAGAAAC ATCTATTAAA ACCACGATCC TCTTAAAAAA 540  
 CAAGCATATT TCGAAAGAGA CAAATTATGT TACAGTTTAC AAACATCTAA GAGCGACAAA 600  
 TTATATCGAA AGGTAAGCTA TGACGTTTAC ATTTTCTTTT TTCATTCTTG TTATTTTGT 660  
 ATTGTTTTTA TATACATTTT CTTCTCTTAC AATAGAGTGA TTTTCTCCG ATTTTATAAA 720  
 ATGACTATAA AGTCATTTTT ATATAAGAGC ACGCATGTCG TAGATTCTCG TTCAAAAATC 780  
 TTTCTGATT TTTTAAGAGC TAGTTTGGCA ACCCTGTTT TTTCAAAAGAA TTTTGATTTT 840  
 TTCAAAAAAA ATTAGTTTAT TTTCTCTTAA TAAATAGAA AACACTTAGA AAATAGAGT 900  
 TGCCAGACTA GCCCTAGAAT GTTTTCCCAA TAAATTACAA TCACTGTGTA TAATTATTG 960  
 GCCAGCCCCA TAAATTATTT AAACCGAAAC TGAAATCGAG CGAAACCAAA TCTGAGCTAT 1020  
 TTCTCTAGAT TAGTAAAAAG GGAGAGAGAG AGGAAGAAAT CAGTTTAAAG TCATTGTCCC 1080  
 TGAGATGTGC GGTTTGGCAA CGATAGCCAC CGTAATCATA GTCATAGCT GCCTACGTCA 1140  
 GGTTCGGCAG CTCCTGTGTC ATCTCACATG GCATACTACA TGCTTGTCA ACCGATCGTC 1200  
 TTGTTCCATC GTCCAAGCCT TGCTTATTCT GAACCAAGAG GATACCTACT CCCAAACAAT 1260  
 CCATCTTACT CATGCAACTT CCATGCAAAAC ACCCACATAT GTTTCCTGAA CAGATCTATT 1320  
 AAAGATCACA ACAGCTAGCG TTCTCCCGCT AGCTTCCCTC TCTCTCTGC CGATCTTTT 1380  
 CGTCCACCAC CATG 1394

## REIVINDICACIONES:

1. Un ácido nucleico aislado, CARACTERIZADO PORQUE codifica una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos Ms45.
2. Un ácido nucleico aislado que codifica una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos Ms45, CARACTERIZADO PORQUE comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 1 o aquellas <sup>secuencias</sup> con por los menos un 70% de identidad con la misma, <sup>que mantiene la función reguladora con preferencia por tejidos masculinos.</sup>
3. Un ácido nucleico aislado que codifica una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos Ms45, <sup>Según Rev. 1</sup> CARACTERIZADO PORQUE comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 2 ~~o aquellas con por los menos un 70% de identidad con la misma.~~
4. Un vector de expresión recombinante, CARACTERIZADO PORQUE comprende el ácido nucleico aislado de la cláusula 2, ligado operativamente con una secuencia de nucleótidos que codifica un gen exógeno de manera tal que dicho gen exógeno se expresa con preferencia en tejidos masculinos.
5. El gen exógeno de la cláusula 4, CARACTERIZADO PORQUE dicho gen exógeno es Ms45.
6. Un método para producir una planta transformada que exprese una secuencia exógena de nucleótidos de forma preferencial en tejidos masculinos, CARACTERIZADO PORQUE comprende la introducción en una planta de dicha secuencia exógena de nucleótidos ligada operativamente con una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos que comprende la secuencia

2000

de nucleótidos de la SEQ ID Nº: 1 o aquellas con por lo menos un 70% de identidad con la misma.

7. El método acorde con la cláusula 6, CARACTERIZADO PORQUE dicho paso de introducción se lleva a cabo por bombardeo con microproyectiles.
8. El método acorde con la cláusula 6, CARACTERIZADO PORQUE dicho paso de introducción utiliza *Agrobacterium*.
9. El método acorde con la cláusula 8, CARACTERIZADO PORQUE dicho *Agrobacterium* comprende un plásmido Ti.
10. El método acorde con la cláusula 6, CARACTERIZADO PORQUE dicha región reguladora se expresa de forma preferencial en tejidos masculinos, en tejidos seleccionados del grupo formado por polen, tapete, antera, espiguilla, células madre del polen y microsporas.
11. El método acorde con la cláusula 6, CARACTERIZADO PORQUE una porción que se expresa a modo preferencial en tejidos masculinos de dicha región reguladora con preferencia por tejidos masculinos está presente en más de una copia.
12. Un método para intervenir en la fertilidad en una planta, CARACTERIZADO PORQUE comprende la producción de una planta transformada donde la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos de la cláusula 2, ligada operativamente a un gen exógeno, <sup>donde</sup> ~~expresa~~ <sup>produce</sup> dicha secuencia exógena de nucleótidos ~~de manera tal que se produzca~~ un impacto sobre la fertilidad. ✓

13. El método acorde con la cláusula 6, CARACTERIZADO PORQUE dicha secuencia exógena de nucleótidos comprende una secuencia de ADN que codifica un sistema regulador procarionte.
14. El método acorde con la cláusula 6, CARACTERIZADO PORQUE dicha secuencia exógena de nucleótidos codifica un gen citotóxico.
15. El método acorde con la cláusula 6, CARACTERIZADO PORQUE dicha secuencia exógena de nucleótidos codifica avidina.
16. El método acorde con la cláusula 6, CARACTERIZADO PORQUE dicha secuencia exógena de nucleótidos codifica DAM metilasa.
17. El método acorde con la cláusula 6, CARACTERIZADO PORQUE dicha secuencia exógena de nucleótidos codifica dicha región reguladora con preferencia por tejidos masculinos ligada operativamente a una unidad nucleotídica complementaria.
18. El método acorde con la cláusula 17, CARACTERIZADO PORQUE dicha unidad nucleotídica complementaria se selecciona del grupo formado por ARN antisentido callasa, ARN antisentido barnasa, ARN antisentido chalcona sintetasa y ARN antisentido Ms45.
19. El método acorde con la cláusula 17, CARACTERIZADO PORQUE dicha unidad nucleotídica complementaria se selecciona del grupo formado por ribozimas y secuencias guía externas.

20. El método acorde con la cláusula 12, CARACTERIZADO PORQUE dicha secuencia exógena de nucleótidos codifica un producto seleccionado del grupo formado por auxinas, rolB y toxina de la difteria.
21. El método acorde con la cláusula 12, CARACTERIZADO PORQUE dicha secuencia exógena de nucleótidos es un gen de esterilidad masculina.
22. El método acorde con la cláusula 21, CARACTERIZADO PORQUE dicho gen de esterilidad masculina es Ms45.
23. El método acorde con la cláusula 12, CARACTERIZADO PORQUE la planta es una monocotiledónea.
24. El método acorde con la cláusula 12, CARACTERIZADO PORQUE la planta es una dicotiledónea.
25. Un método para producir semillas híbridas, CARACTERIZADO PORQUE comprende sembrar en yuxtaposición de polinización cruzada una primera planta con fertilidad masculina y una segunda planta con esterilidad masculina, donde la segunda planta con esterilidad masculina fue producida de acuerdo con el método de la cláusula 6, dejar que se produzca la polinización cruzada y cosechar las semillas resultantes.
26. El método acorde con la cláusula 25, CARACTERIZADO PORQUE dicha planta es maíz.
27. Una planta transformada que expresa una secuencia exógena de nucleótidos a modo preferencial por tejidos masculinos, CARACTERIZADA PORQUE comprende una secuencia exógena de nucleótidos ligada

- operativamente a una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 1.
28. La planta transformada de la cláusula 27, CARACTERIZADA PORQUE dicha secuencia exógena de nucleótidos está ligada operativamente a una región reguladora con preferencia por tejidos masculinos, de la cual una porción de expresión preferida en tejidos masculinos puede estar presente en más de una copia.
29. La planta transformada de la cláusula 27, CARACTERIZADA PORQUE dicha planta es una monocotiledónea o dicotiledónea.
30. La planta transformada de la cláusula 27, CARACTERIZADA PORQUE dicha planta se selecciona del grupo formado por maíz, girasol, soja, trigo, canola, arroz y sorgo.
31. La planta transformada de la cláusula 28, CARACTERIZADA PORQUE dicha planta se selecciona del grupo formado por maíz, girasol, soja, trigo, canola, arroz y sorgo.
32. Tejido, CARACTERIZADO PORQUE es de la planta transformada de la cláusula 27 ó 28.
33. El tejido transformado de la cláusula 32, CARACTERIZADO PORQUE dicho tejido se selecciona del grupo formado por polen, mazorcas, óvulos, anteras, espiguillas, pistilos estambres y células vegetales.
34. Células vegetales transformadas, CARACTERIZADAS PORQUE provienen de la planta transformada de la cláusula 27.



## REGIÓN REGULADORA CON PREFERENCIA POR TEJIDOS MASCULINOS Y MÉTODO PARA EL USO DE LA MISMA

### RESUMEN

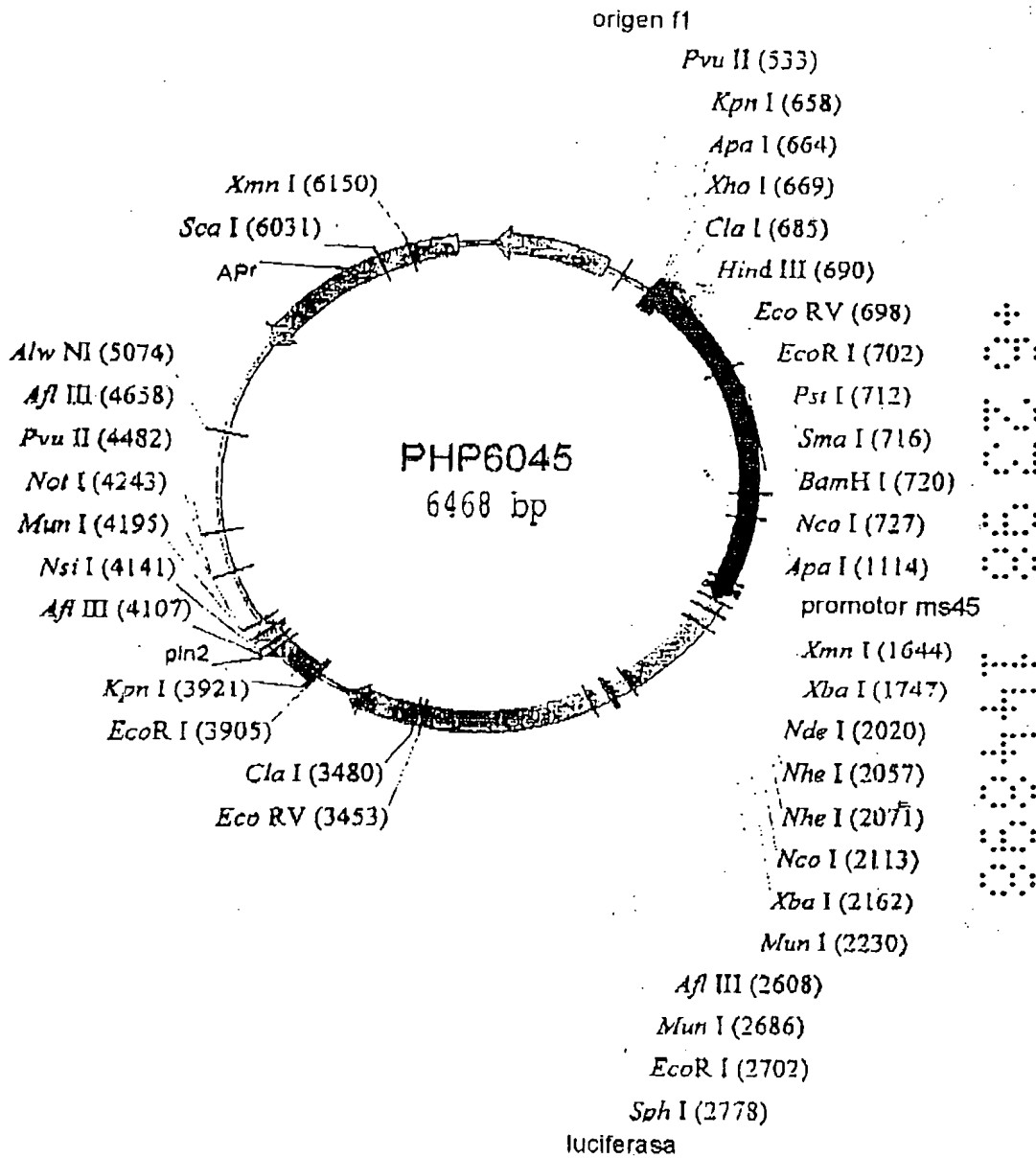
La presente invención se relaciona con una secuencia aislada de ácidos nucleicos que codifica la región reguladora con preferencia por tejidos masculinos Ms45. En un aspecto esta invención se relaciona con el uso de esta región reguladora con preferencia por tejidos masculinos para intervenir en la fertilidad. Un ejemplo de dicho uso es la producción de semillas híbridas, tal como en un sistema de esterilidad masculino. La región reguladora con preferencia por tejidos masculinos Ms45 se puede ligar operativamente con genes exógenos, como aquellos que codifican citotoxinas, unidades nucleotídicas complementarias y moléculas inhibidoras. Esta invención también se relaciona con células vegetales, tejidos vegetales y plantas diferenciadas que contienen la región reguladora de esta invención.

27 JUN 84



Figura 2

Mapa del plásmido PHP6045



**Figura 3**  
**Extensión con cebadores del Ms45**

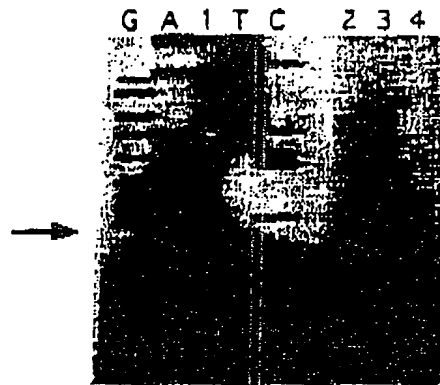
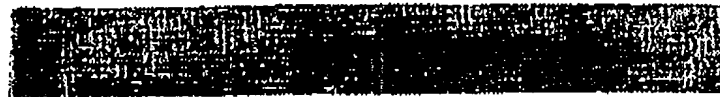


Figura 4

Transferencia Northern del Ms45 en el desarrollo de anteras

Etapa del desarrollo de las anteras

Premei6tica temprana  
Premei6tica tardía  
Leptoteno  
Leptoteno-Zigoteno  
Zigoteno-Paquiteno  
Diploteno-Diaquinesis  
Meiosis I  
Meiosis II-Cuarteto  
Telofase II-Cuarteto  
Cuarteto  
Cuarteto-Liberaci6n de cuarteto  
Uninuclear temprana  
Uninuclear temprana-Media temprana  
Media-Uninuclear  
Media tardía-Uninuclear tardía  
Uninuclear tardía



MS45



RIBOSOMAL

Figura - Análisis de la transferencia Northern del ARNm de anteras

**Figura 5**  
**Especificidad de etapa de la región reguladora con**  
**preferencia por tejidos masculinos del Ms45**

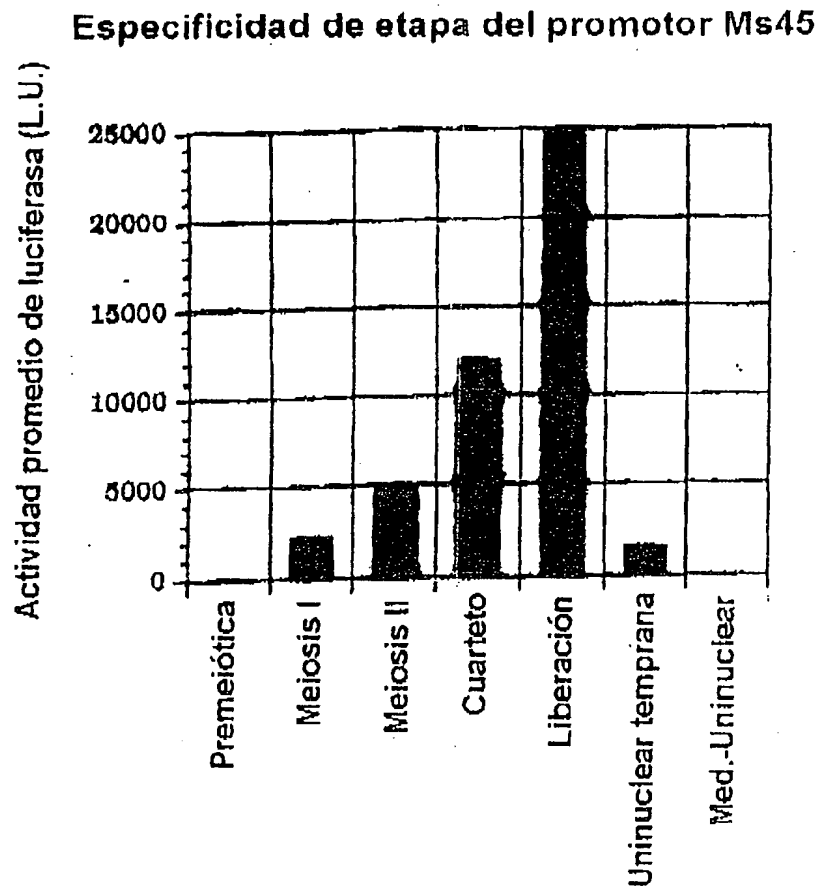


Figura 6  
Especificidad de tejido

Especificidad de tejido del promotor MS45

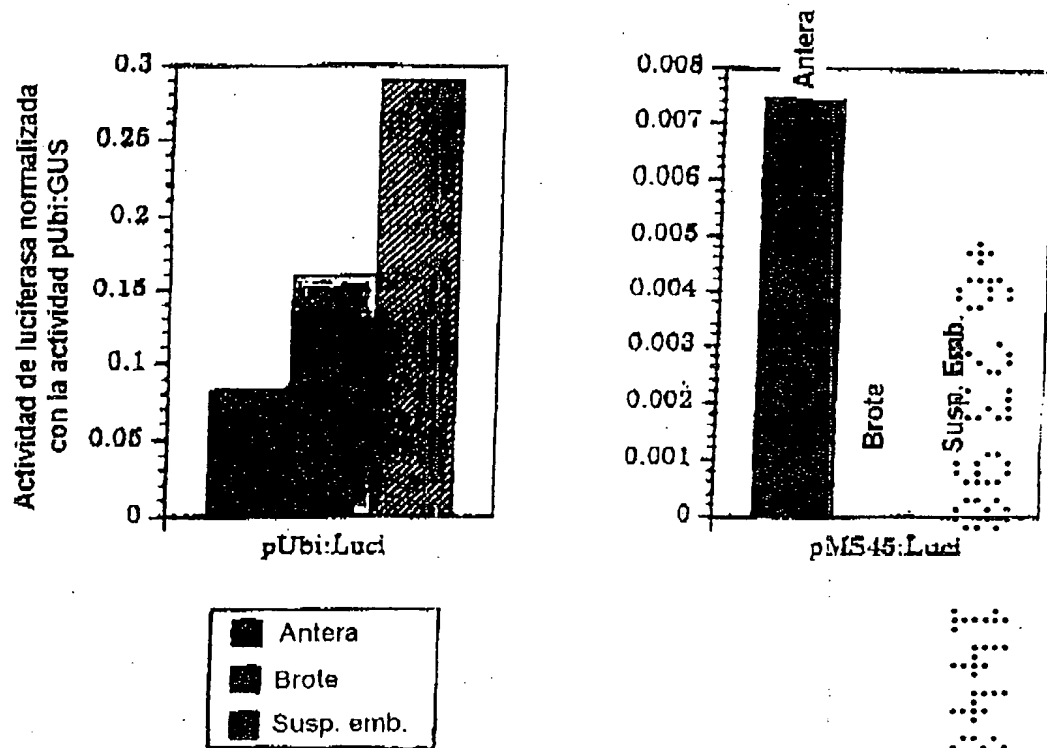
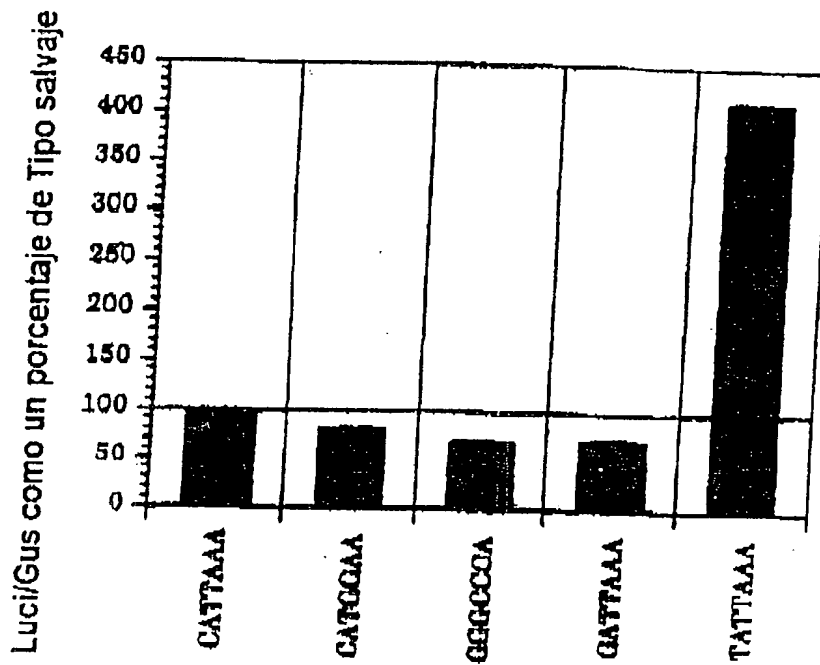


Figura 7  
Análisis mutacional del TATA box Ms45

Análisis mutacional del TATA box putativo MS45



RECEIVED  
23 JUN 1988  
FBI - MEMPHIS